



**Ana Margarida Barata
Moreira Paradela**

**Disseminação de genes de resistência em estirpes
clínicas de *Escherichia coli***

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, do departamento de Biologia, da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira
Investigadora Pós-Doc, CESAM

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A todos quantos contribuíram, de uma forma ou de outra, para a realização deste trabalho quero manifestar o meu agradecimento.

À Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, pela orientação científica desta Tese de Mestrado, pelo seu empenho, dedicação, críticas e opiniões durante a preparação do manuscrito e realização do trabalho laboratorial.

Ao Dr. Elmano Ramalheira pela cedência das estirpes utilizadas neste trabalho

A todas as colegas do laboratório de Microbiologia Molecular do departamento de Biologia pela ajuda, boa disposição, sugestões e amizade demonstrada.

À Sónia Ferreira pelas palavras amigas e de encorajamento na realização deste trabalho. Acima de tudo, obrigada por me continuar a acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica.

Aos meus pais, pelo amor e incentivo recebido durante este ano

Por último, uma palavra especial para o Henrique e Inês, pelo apoio incondicional, pela compreensão, carinho e por estarem sempre a meu lado.

resumo

A multiresistência a antimicrobianos é a principal causa de falha terapêutica no tratamento de infecções bacterianas. Cada vez mais estudos sugerem que as bactérias conseguem resistir a múltiplos antibióticos através de mecanismos intrínsecos, tais como a presença de genes que codificam beta-lactamases bem como a presença de bombas de efluxo. Extensivos estudos mostraram também que diversos elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposões, facilitam a troca de material genético entre géneros e espécies de bactérias.

Membros da família das Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* em particular é o principal agente responsável por infecções urinárias. A crescente alteração do fenótipo de resistência das estirpes isoladas, nomeadamente em pacientes oriundos da comunidade, é motivo de grande preocupação e constitui um grave problema à escala mundial. Com o presente trabalho pretendeu-se averiguar a prevalência e disseminação de genes de resistência presentes na população em estudo.

Verificou-se que 79% da população em estudo apresentava resistência a pelo menos uma classe de antibióticos, 30 % revelou um fenótipo de multiresistência e 21% não apresentou qualquer tipo de resistência aos compostos testados.

A presença da β -lactamase TEM foi detectada em todos isolados que apresentavam resistência à Ampicilina. O gene que codifica a OXA foi detectado em 12 dos isolados. Em 12 isolados verificou-se a presença da β -lactamase CTX-M associada à sequência de inserção *ISEsp1* localizada a montante. O gene *int1* está verificou-se estar presente em 17 dos isolados.

Concluiu-se deste estudo que a resistência mais significativa se verificou relativamente à ampicilina e às cefalosporinas de primeira geração, o que leva a sugerir que estes antibióticos não deveriam ser usados como agente único no tratamento deste tipo de infecções.

Por outro lado, a presença de diferentes tipos de β -lactamases na população em estudo reforça a necessidade de monitorização de rotina na disseminação deste tipo de determinantes de resistência. O exemplo das β -lactamases CTX-M-15, mediadas por plasmídeos é preocupante, uma vez que constitui um grave problema dada a facilidade de disseminação dentro da mesma espécie ou até mesmo entre espécies diferentes.

Por último, a elevada prevalência de estirpes resistentes provenientes da ala pediátrica e a emergência de estirpes multirresistentes nesta mesma população é preocupante e requer uma vigilância apertada, uma vez que muitos dos agentes antimicrobianos utilizados não são indicados para o tratamento destes pacientes.

Palavras chave: *Escherichia coli*, multiresistência , ESBLs

Abstract

Multidrug resistance is the major cause of clinical failure when treating bacterial infections. Increasing evidence suggests that bacteria can resist multiple antibiotics through intrinsic mechanisms that rely on gene products such as B-lactamases and efflux pumps. Extensive studies have shown that mobile genetic elements, such as plasmids and transposons, facilitate the dissemination of genetic determinants among species or genera of bacteria.

E. coli is the most common pathogen responsible for Urinary Tract Infections (UTI) in hospital population. The emerging changes in the resistance phenotype of this strains, mainly those from community settings, can represent a serious problem worldwide.

The aim of the present study was to screen for genetic resistance determinants in an *E. coli* population, collected from patients of the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro-Portugal.

The population studied (n=100) was collected from different biological products and revealed that 79% of the isolates were resistant to, at least, one class of antibiotics and 30% showed a multi resistant phenotype. 21% of the isolates did not express resistance to any of the antibiotics tested.

The presence of TEM-type encoding gene was detected in all of the isolates that showed resistance to ampicillin. The gene encoding for OXA was present in twelve isolates. Twelve strains carried a CTX-M gene associated with the insertion sequence *ISEsp1*, located upstream of this gene. *int1* gene was detected in 17 isolates.

Resistance to ampicillin and to the first generation cephalosporins was quite significant, meaning that these antibiotics shouldn't be used as the single agent for empirical treatment of a suspected UTI. The presence of different types of ESBL's among the isolates highlights the importance of routine screening for ESBL producers. CTX-M-15, found in 12 isolates, is plasmid mediated and, therefore, can represent a dissemination problem, as those structures can be easily mobilised between strains or even species.

The high prevalence of *E. coli* resistant strains in paediatric patients and the emergence of multi resistant strains in this specific population require careful surveillance, as many antimicrobials used are not appropriate for the treatment of paediatric patients.

Key words : *Escherichia coli*, multiresistance, ESBLs

I- INTRODUÇÃO	1
1. <i>Escherichia coli</i>	5
1.1 Caracterização do género	5
1.2 Factores de virulência	6
2. Antibióticos	6
2.1 Antibióticos β -lactâmicos	9
2.1.1 Mecanismo de acção	10
2.1.2 Mecanismo de resistência	11
2.2 Quinolonas	11
2.2.1 Mecanismo de acção	13
2.2.2 Mecanismo de resistência	13
2.3 Aminoglicosídeos	14
2.3.1 Mecanismo de acção	15
2.3.2 Mecanismo de resistência	16
3. Mecanismos de resistência aos antibióticos	17
3.1 Resistência Intrínseca	17
3.2 Resistência Adquirida	17
3.2.1 Transferência de genes entre bactérias	18
3.2.2 Elementos genéticos móveis associados à resistência a antibióticos: Plasmídeos, sequências de inserção, transposões e integrões	19
4. Beta-Lactamases	23
5. Tipagem bacteriana	28
5.1 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico	29
5.2 Técnicas de Tipagem baseadas em PCR	30

Índice	
5.3 Aplicações	31
II- OBJECTIVOS	33
III- MATERIAL E MÉTODOS	37
1. Isolados bacterianos	38
2. Identificação e susceptibilidade dos isolados de <i>E. coli</i>	38
2.1 Identificação-Coloração de Gram	39
2.2 Sistema Vitek2 Compact	40
2.3 Determinação da concentração mínima inibitória	41
2.4 Detecção de β -lactamases de espectro alargado	41
3. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR	42
3.1 Pesquisa de β -lactamases TEM, OXA e CTX-M	43
3.2 Pesquisa de integrons	44
4. Electroforese em gel de agarose e visualização do DNA	44
5. Preparação da amostra, determinação da sequência nucleotídica e análise dos fragmentos sequenciados	45
5.1 Extração de bandas de gel de Agarose	45
5.2 Análise da sequência nucleotídica	45
6. Estudo da variabilidade genética	45
6.1 Condições da electroforese	46
6.2 Análise dos perfis de clonalidade	46
IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
1. Isolados bacterianos	49
2. Dados epidemiológicos	50
2.1 Susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>E.coli</i>	50
2.2 Detecção de β -lactamases de espectro alargado	55

Índice

3. Pesquisa de genes codificantes de β-lactamases por PCR	56
4. Pesquisa de integrões	61
5. Estudo da variabilidade genética	63
V- CONCLUSÕES FINAIS	69
VI-BIBLIOGRAFIA	73

Índice de Figuras	
Figura 1. Estrutura química dos antibióticos B-lactâmicos	10
Figura 2. Estrutura química do ácido nalidíxico e algumas fluorquinolonas existentes	12
Figura 3. Estrutura química de alguns aminoglicosídeos	15
Figura 4. Representação esquemática dos diferentes mecanismos de transferência horizontal de genes entre bactérias	19
Figura 5. Representação esquemática de um plasmídeo incluindo 3 regiões: região promotora, Resistência a antibióticos e origem de replicação	20
Figura 6. Representação esquemática de uma sequência de inserção	21
Figura 7. Representação esquemática da estrutura de um transposão	22
Figura 8. Representação esquemática da estrutura de um integrão e do mecanismo de inserção das cassetes de genes de resistência	23
Figura 9. Distribuição geográfica, a nível mundial, dos diferentes grupos de CTX-M	27
Figura 10. Resolução relativa das várias técnicas de tipagem molecular	31
Figura 11. Coloração de Gram: bactérias de Gram negativo (A) e bactérias de Gram positivo (B)	40
Figura 12. Representação gráfica dos isolados clínicos estudados, pelas diferentes faixas etárias	49
Figura 13. Origem dos isolados clínicos de <i>E. coli</i> seleccionados para o presente estudo	50
Figura 14. Perfil de resistência dos isolados clínicos estudados. O eixo do X representa valores de resistência traduzidos em percentagem e o eixo do Y representa os antibióticos testados	51

Índice de Figuras

Figura 15. Gráfico que representa perfil de resistência dos isolados a agentes β -lactâmicos, incluindo Penicilinas e associação com inibidores das β -lactamases, Cefalosporinas e Carbapenemos 52

Figura 16. Gráfico representando a distribuição dos isolados multirresistentes 53

Figura 17. Representação gráfica dos isolados resistentes a quinolonas de segunda e terceira geração de Quinolonas 53

Figura 18. Distribuição de isolados resistentes aos diferentes Aminoglicosídeos 54

Figura 19. Distribuição de estirpes produtoras de ESBL dando particular relevo aos isolados produtores vindos da ala pediátrica (24%) 55

Figura 20. Fotografia de uma electroforese em gel de agarose dos produtos resultantes da amplificação do gene *bla_{TEM}* 56

Figura 21. Fotografia de uma electroforese em gel de agarose dos produtos resultantes da amplificação do gene *bla_{OXA}*. 58

Figura 22. Representação gráfica da Co-resistência observada em estirpes produtoras de CTX-M 59

Figura 23. Esquema representativo do ambiente genético associado a *bla_{CTX-M}* 59

Figura 24. Perfis electroforéticos dos fragmentos obtidos com a utilização dos iniciadores ERIC, referenciados na Tabela 7 65

Figura 25. Dendograma obtido após a análise dos perfis de ERIC obtidos 67

Tabela 1. Classificação de β -lactamases	24
Tabela 2. Indicação da concentração final dos componentes da reacção de PCR. O tampão referenciado possui sulfato de amónia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) para uma melhor desnaturação do DNA.	42
Tabela 3. Sequência dos iniciadores para pesquisa das diferentes famílias de β -lactamases e o tamanho do respectivo amplicão	43
Tabela 4. Condições utilizadas nas reacções de amplificação das diferentes famílias de β -lactamases	43
Tabela 5. Sequência dos iniciadores para pesquisa do gene codificante da integrase de classe 1 e zonas variáveis e o tamanho dos respectivos amplicões	44
Tabela 6. Condições utilizadas nas reacções de amplificação de integrases de classe 1 e respectivas zonas variáveis	44
Tabela 7. Sequência dos iniciadores para amplificação por ERIC-PCR	46
Tabela 8. Condições das reacções de amplificação para ERIC-PCR	46
Tabela 9. Isolados positivos para a presença de integrões de classe 1, genes cassette amplificados e respectivo tamanho	62

AES- Advanced expert system

ATCC - American Type Culture Collection

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CMI - .concentração mínima inibitória

DNA –Ácido desoxiribonucleíco

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetraacético

ERIC - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements.

ESBL – Extended Spectrum beta-lactamases

ISCR - Insertion sequence common region

PB – Pares de bases

PBPs – Penicillin binding proteins.

PCR – Polymerase chain reaction

REP - Repetitive Extragenic Palindromic elements.

RNA – Ácido ribonucleico

SI – Sequência de inserção

TAE - Tris-Acetate e EDTA

I. Introdução

A emergência de resistência aos antibióticos a nível comunitário e hospitalar é considerada por muitos como uma das mais importantes ameaças à saúde humana no século XXI. A resistência aos antibióticos constitui assim um grave problema de saúde pública à escala mundial, que se traduz num inevitável aumento da morbilidade e mortalidade causadas por doenças infecciosas tendo como consequências, a diminuição da qualidade de vida e o aumento dos custos com a saúde e cuidados médicos (Sipahi 2008).

A resistência bacteriana emergiu pouco depois da introdução dos antibióticos, nos anos 1930 e 1940. Em meados de 1940, dois anos após a introdução da penicilina no mercado, surgiu a primeira estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina (Spink WW 1945; Ligon 2004). Ernst Chain foi o primeiro a descrever a penicilinase, enzima produzida pelas bactérias para destruir a penicilina (Spink WW 1945).

Em consequência da diversidade de ambientes que colonizam e das características desses mesmos ambientes, têm sido identificados genes que conferem vantagens selectivas às bactérias que os possuem. Um exemplo são os genes de resistência aos antibióticos. A utilização inapropriada e indiscriminada dos antibióticos nos tratamentos forçam esses microrganismos a adaptar-se ou a morrer, designando-se este fenómeno por “pressão selectiva”. As bactérias que conseguem resistir e sobreviver nestas condições, são portadoras de genes de resistência a antibióticos o que torna ineficaz o uso do respectivo antibiótico (Pallecchi, Bartoloni *et al.* 2008).

Antibióticos, como por exemplo, os glicopéptidos, as quinolonas, os aminoglicosídeos e as cefalosporinas têm sido também aplicados na alimentação animal, como profiláticos das infecções e como promotores de crescimento. Também nos animais pode haver selecção de estirpes resistentes, que facilmente actuam como reservatório de genes de resistência, contribuindo para a entrada de bactérias multiresistentes na cadeia alimentar e no meio ambiente (Shea 2003). Tendo em conta

este panorama, a melhor opção será usar os antibióticos quando absolutamente necessário restringindo a sua aplicação na pecuária (Aarestrup, Wegener *et al.* 2008).

Em ambiente hospitalar são vários os factores que conduzem a um rápido aparecimento de resistências. Entre estes factores podemos destacar a automedicação, que pode levar ao uso incorrecto da dose do antibiótico, seleccionando desta forma estirpes resistentes entre a flora comensal e originando uma infecção por uma bactéria oportunista eventualmente resistente ao antibiótico e ainda a prescrição, muitas vezes, desnecessária ou inapropriada, para o tratamento de uma determinada infecção.

Neste ambiente, a disseminação de bactérias multirresistentes poderá ser facilitada por diversos factores que vão desde uma deficiente higiene das mãos, bem como pela transferência de doentes entre hospitais, com a importação de estirpes multirresistentes, e ainda as repetidas transferências de doentes colonizados e/ou infectados entre hospitais lares de acolhimento (MacGowan and on behalf of the 2008).

O controlo das resistências passa por 3 estratégias fundamentais: programas eficazes de controlo da infecção; vigilância epidemiológica; e optimização da utilização de antibióticos. Para controlar adequadamente as resistências à escala global é necessário uma tomada de consciência generalizada, reconhecimento e estudo do problema, e ainda uma abordagem multidisciplinar (Zwar, Wolk *et al.* 1999).

Em suma o uso de antibióticos não é um acto gratuito mas sim um acto de inteligência.

1. *Escherichia coli*

1.1. Caracterização do género

Escherichia coli é um bacilo de Gram negativo pertencente à família Enterobacteriaceae. Possui exigências nutricionais simples, é aeróbio/anaeróbio facultativo e apresenta um perfil bioquímico caracterizado por fermentar a lactose, reduzir os nitratos a nitritos, produzir indol, por possuir a decarboxilase da lisina e da ornitina e ser oxidase-negativo. A ausência da actividade da citocromo-oxidase constitui uma importante característica, uma vez que pode diferenciar as enterobactérias de bacilos de Gram negativo não fermentadores.

Dentro da família Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* é a espécie de maior relevância clínica, sendo o principal agente de infecções urinárias baixas (> 80%) devido à proximidade entre o tracto gastro-intestinal e tracto urinário. Contudo, pode ascender e originar pielonefrite, entrar na corrente sanguínea (bacteriémia) ou ocasionar infecção localizada em qualquer outro local. Está também associada a pneumonias em ambiente hospitalar, septicemias, abscessos e a gastroenterites contudo, até há pouco tempo este agente, não era muito valorizado uma vez que é um comensal do intestino (Tumbarello, Sali *et al.* 2008).

Embora *E. coli* seja um habitante indígena do tracto intestinal algumas estirpes podem ocasionar perturbações entéricas, entre as quais podemos destacar:

- *E. coli* enterotoxígenas: produtoras de dois tipos de toxinas (termo-lábil e termo-estável) as quais são responsáveis pela patogénese da infecção entérica. Estas estirpes são responsáveis pela chamada diarreia do viajante;
- *E. coli* enteroinvasivas: invadem e destroem o epitélio do cólon ocasionando uma diarreia aguda com sangue e leucócitos nas fezes;
- *E. coli* enteropatogénicas: classicamente associadas à diarreia do recém nascido;
- *E. coli* enterohemorrágicas: produzem uma verotoxina, que ocasiona no Homem colites hemorrágicas, diarreias não sanguinolentas e síndrome hemolítico-

urémica. O principal serótipo associado com a colite hemorrágica é o O₁₅₇:H₇ (Turner, Chaudhuri *et al.* 2006).

1.2 Factores de virulência

São componentes de um microrganismo que determinam a sua capacidade para provocar doença, mas não são necessários para a sua viabilidade. Têm sido caracterizadas duas classes: toxinas biológicas, muitas das quais são exotoxinas, e moléculas de adesão de superfície que possibilitam ao microrganismo invadir e colonizar um hospedeiro.

E. coli possui múltiplos flagelos peritricos dispostos em volta da célula e possui fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação ao tecido do hospedeiro, impedindo o arrastamento pela urina ou diarreia. Possuem lipopolissacarídeo (LPS), como todas as bactérias de Gram negativo. Esta molécula externa activa o sistema imunitário de forma desproporcionada e a vasodilatação excessiva provocada pelas citocinas produzidas pode levar ao choque séptico e morte em casos de Septicemia (Toma, Martinez Espinosa *et al.* 2004).

2. Antibióticos

A elevada mortalidade provocada pelas doenças infecciosas mobilizou os cientistas para a pesquisa de compostos naturais e produtos químicos com propriedades antimicrobianas. Neste contexto, no século XVI, o médico Aureolus Paracelsus usou compostos de antimónio no tratamento geral das infecções e derivados de mercúrio no tratamento específico da sífilis. Outros exemplos se seguiram, Thomas Sydenham no século XVII utilizou a casca de cinchona no tratamento da malária (Warhurst 1981).

No entanto, o verdadeiro início da quimioterapia com sucesso ocorre no século XIX com Paul Ehrlich, ao utilizar um composto de arsénio (salvarsan) no tratamento da sífilis (Schwartz 2004). Contudo, em 1926 foi descoberta por Fleming a primeira substância natural produzida por um fungo com propriedades antibacterianas - a Penicilina (Ligon 2004; Abeylath and Turos 2008).

Esta descoberta veio revolucionar o tratamento das doenças infecciosas, uma vez que os efeitos desta substância sobre as células do Homem eram mínimas, ao contrário do efeito dos compostos químicos. Nos vinte e cinco anos que se seguiram, a pesquisa terapêutica centrou-se em compostos de origem microbiana designados “antibióticos”.

Os antibióticos são substâncias naturalmente produzidas por fungos ou por bactérias ou podem ser compostos de origem sintética que, em pequenas quantidades têm a capacidade de inibir o crescimento ou matar os microrganismos. A classificação dos antibióticos é feita com base na sua estrutura química, origem biológica e uso terapêutico.

Antibióticos pertencentes a uma mesma classe têm um mecanismo de acção e espectro de actividade semelhante; geralmente partilham o mesmo tipo de resistência e são também semelhantes a nível de toxicidade. Um antibiótico ideal exhibe uma toxicidade selectiva. Muitas vezes a toxicidade selectiva é mais relativa do que absoluta, isto implica que a droga numa concentração tolerada pelo organismo do hospedeiro tenha efeito no microrganismo causador da infecção. A toxicidade selectiva está relacionada com receptores específicos para uma dada droga. Alguns antibióticos, que têm toxicidade selectiva sobre determinados patogénicos, são chamados de antibióticos de espectro reduzido. Antibióticos que se mostrem eficazes contra uma grande variedade patogénicos designam-se de largo espectro (Magnet and Blanchard 2005)

A actividade antimicrobiana pode ser medida *in vitro*, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para um resultado confiável dos testes, é preciso trabalhar com uma metodologia padronizada. O método padronizado que é actualmente recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute, antigo National Commitee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/ NCCLS) baseia-se no método originalmente descrito por Bauer *et al.*. Os procedimentos para determinar a actividade inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo ou em agar. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CLSI 2006).

Enquanto uns antibióticos apenas inibem a multiplicação bacteriana e por isso são designados bacteriostáticos, outros que activamente matam o microrganismo, denominam-se bactericidas. Os mais importantes bactericidas são as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas.

O mecanismo de acção da maioria dos antibióticos é sobejamente conhecido e como já foi referido, semelhante dentro de uma mesma classe, o que leva ao aparecimento de um padrão de resistência cruzada. Os antibióticos são denominados antiparietais, actuando ao nível da síntese do peptidoglicano; antimembranares afectando a permeabilidade da membrana celular; inibidores da síntese proteica associando-se a alvos ribossomais; inibidores da síntese dos ácidos nucleicos e antibióticos antimetabolitos (McManus 1997).

O conhecimento destes mecanismos é uma importante ferramenta para a compreensão da acção sinérgica destes mesmos antibióticos, uma vez que um efeito deste tipo, o efeito sinérgico apenas ocorre quando a combinação de antibióticos escolhida actua em diferentes locais alvo.

A sensibilidade aos antibióticos é variável entre as diferentes espécies bacterianas, entre diferentes estirpes e até mesmo dentro da mesma população bacteriana. O padrão de sensibilidade de algumas espécies bacterianas tais como o pneumococo, gonococo, meningococo e *Haemophilus influenzae* é relativamente previsível. Contudo outros, como os estafilococos, enterococos, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* e *Mycobacterium tuberculosis* apresentam consideráveis variações (Malhotra-Kumar, Mazzariol et al. 2008)

Os fármacos anti-infecciosos em geral e os antimicrobianos em particular têm demonstrado uma eficácia inquestionável no tratamento das infecções, sendo a sua utilidade terapêutica indiscutível. Contudo, após a sua introdução na prática clínica, rapidamente se verificou que diferentes microrganismos eram susceptíveis de adquirir resistência a fármacos aos quais eram inicialmente sensíveis, sendo o exemplo dos estafilococos produtores de β -lactamases o mais conhecido (Livermore and Woodford 2006; R. H. Deurenberg 2007).

A emergência de estirpes resistentes, como resultado da pressão selectiva, é hoje em dia uma realidade preocupante. A utilização, generalizada e precoce, de uma terapêutica antimicrobiana de largo espectro favorece o crescimento e selecção dos microrganismos resistentes, ao eliminar as estirpes sensíveis.

2.1 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos representam a classe mais variada e amplamente utilizada de antimicrobianos em todo o mundo (Pitout, Nordmann *et al.* 2005; Livermore and Woodford 2006). Têm uma utilização terapêutica generalizada devido ao seu espectro de acção, baixa toxicidade e características farmacocinéticas.

A estrutura básica consiste num anel de tiazolina ligado a um anel β -lactâmico que é essencial à actividade antibacteriana. Esta classe de antibióticos divide-se em seis grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemos, cefamicinas e inibidores de β -lactamases (Livermore and Woodford 2006; Smet, Martel *et al.* 2008).

De acordo com a estrutura e espectro de actividade as penicilinas com acção contra microrganismos de Gram negativos são divididas em aminopenicilinas (ex:Ampicilina), carboxipenicilinas (ex: Carbenicilina) e ureidopenicilinas (ex: Piperacilina).

As cefalosporinas actualmente disponíveis são usualmente classificadas em 4 classes - 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações - de acordo com o seu espectro de actividade (Livermore and Woodford 2006). As cefalosporinas de 1^a geração são activas essencialmente sobre bactérias de Gram positivo, sendo a sua actividade limitada sobre algumas de Gram negativo. À medida que se avança nas diferentes gerações, o espectro para Gram negativo amplia-se (as cefalosporinas de 4^a geração são as mais activas) mas perde-se alguma actividade para bactérias de Gram positivo. As cefamicinas são habitualmente classificados no grupo das cefalosporinas dada a sua grande semelhança farmacológica (Livermore and Woodford 2006).

Os monobactâmicos são altamente resistentes à inactivação por β -lactamases, sendo principalmente indicados nas falhas terapêuticas com cefalosporinas de 3^a geração, para o tratamento das infecções por bactérias de Gram negativo. O aztreonamo

é a única molécula comercializada deste grupo. Apresenta grande analogia com a ceftazidima e foi o primeiro a ser utilizado na terapêutica.

Os carbapenemos, representados pelo imipenemo, meropenemo e ertapenemo apresentam um espectro de actividade muito amplo, sendo resistentes à maioria das β -lactamases e activos contra bactérias de Gram positivo, de Gram negativo e anaeróbios. Contudo, os estafilococos resistentes à meticilina não são, de um modo geral, susceptíveis e a susceptibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* é variável. O imipenemo é um pouco mais activo do que o meropenemo contra bactérias de Gram positivo.

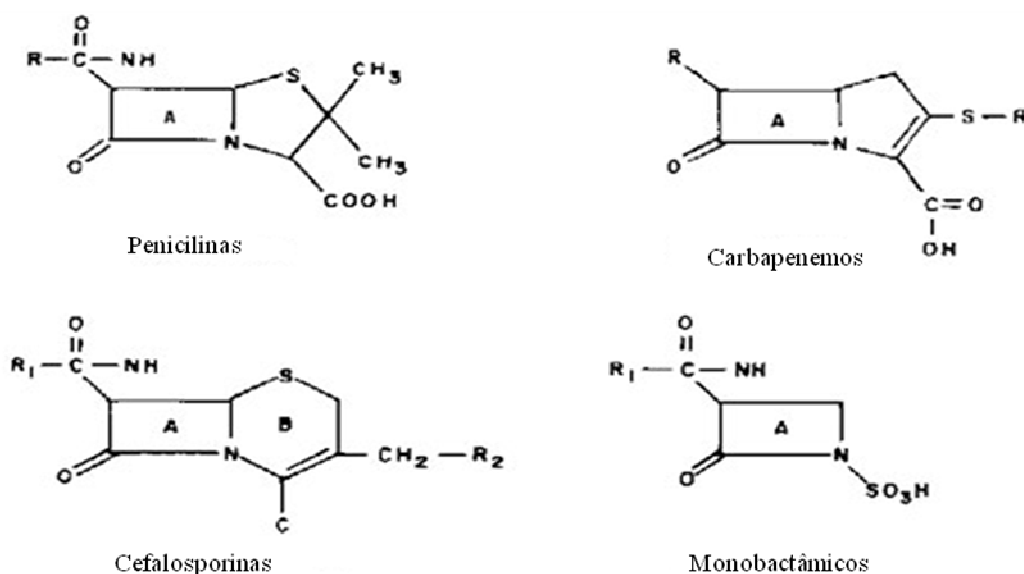


Figura 1. Estrutura química dos antibióticos B-lactâmicos.

2.1.1 Mecanismo de Acção

Os antibióticos β -lactâmicos (Fig.1) são antibióticos bactericidas, que inibem a síntese do peptidoglicano, principal constituinte da parede celular, interrompendo o processo de transpeptidação. Esse mecanismo baseia-se na união de β -lactâmicos a receptores específicos localizados na superfície interior da membrana celular bacteriana, denominados “proteínas receptoras de penicilina” (PBPs). As PBP's possuem um papel chave na fase final da síntese de peptidoglicano, catalisando a ligação cruzada das subunidades da parede celular (Yamada, Watanabe et al. 2007).

Para que possam actuar, os antibióticos β -lactâmicos devem primeiro penetrar na parede celular bacteriana. A camada glicopeptídica das bactérias de Gram positivo é espessa e externa a uma membrana celular única, enquanto a camada glicopeptídica das bactérias de Gram negativo, que é muito mais delgada, encontra-se entre a membrana plasmática e membrana celular externa. Desta forma, facilmente se compreende que os antibióticos β -lactâmicos actuam mais facilmente nas bactérias de Gram positivo.

2.1.2 Mecanismo de Resistência

As beta-lactamases são a principal causa de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. A produção destas enzimas é codificada geneticamente quer no cromossoma bacteriano quer em plasmídeos e transposões. As enzimas, PBP's, actuando ao nível do periplasma impedem o antibiótico de atingir o seu alvo (Livermore and Woodford 2006).

Outro mecanismo responsável pela resistência aos beta-lactâmicos está relacionado com alterações nas PBPs. As alterações genéticas poderão alterar a estrutura dessas enzimas diminuindo a afinidade de ligação à penicilina e às cefalosporinas. Isso resulta em diminuição da afinidade dos β -lactâmicos.

2.2 Quinolonas

As quinolonas são um grupo de substâncias químicas antibacterianas inteiramente sintéticas. A primeira quinolona introduzida foi o ácido nalidíxico (Figura 2), seguindo-se a flumequina e o ácido oxonílico. Estas substâncias foram denominadas de quinolonas de primeira geração. Devido a grande eficácia contra a maioria das Enterobacteriaceae, este grupo tornou-se de escolha no combate de infecções urinárias de difícil tratamento; por outro lado, nenhuma destas quinolonas de primeira geração possui qualquer actividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, anaeróbios e bactérias de Gram positivo (Appelbaum and Hunter 2000).

Na década de 80, intensas pesquisas realizadas a partir destas primeiras quinolonas originaram as denominadas quinolonas de segunda geração, que diferem das primeiras fundamentalmente, pela adição de um átomo de flúor (Figura 2), a partir de

então denominadas fluoroquinolonas, sendo as principais representantes a enrofloxacin, a norfloxacin, a ciprofloxacin, a ofloxacin, a lomefloxacin e a perfloxacin (Appelbaum and Hunter 2000).

Com a descoberta destas substâncias, ampliou-se o espectro de acção das quinolonas, pois estas fluoroquinolonas possuem, além da acção contra Enterobacteriaceae, acção contra a *P. aeruginosa*, sendo que a ciprofloxacin e ofloxacin possuem ainda actividade contra *Chlamydia* sp, *Mycoplasma* sp e *Legionella* sp. As quinolonas de terceira geração (levofloxacin e esparfloxacin), as quais possuem ainda uma cadeia ciclopropil, além de actuarem nos microrganismos sensíveis às quinolonas de segunda geração, são eficientes no combate ao *Streptococcus pneumoniae*.

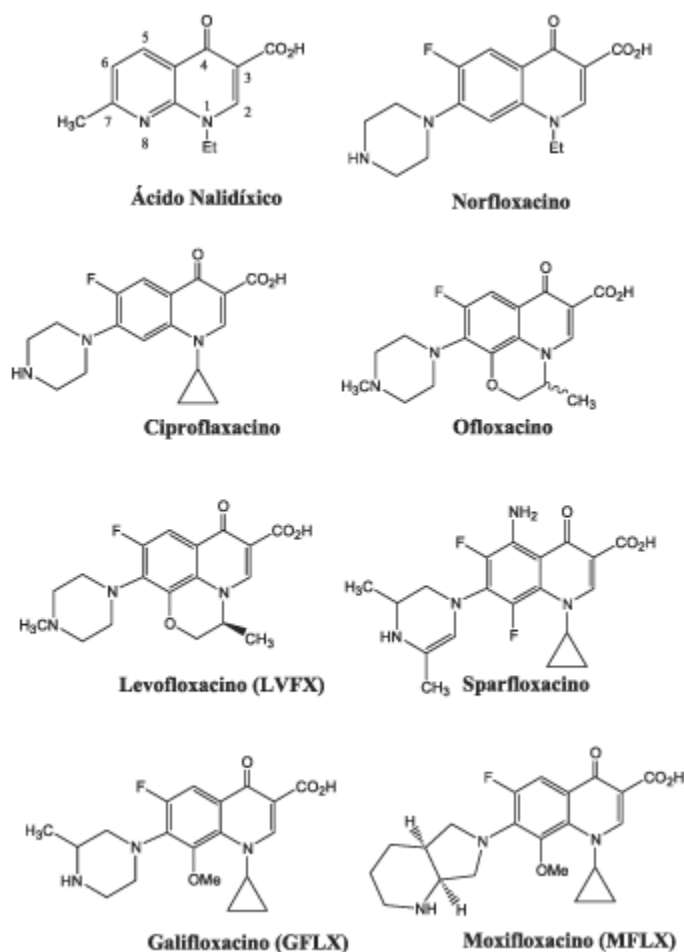


Figura 2. Estrutura química do ácido nalidíxico e de algumas fluoroquinolonas existentes

2.2.1 Mecanismo de Acção

As quinolonas actuam inibindo a acção das topoisomerases tipo II: DNA girase e topoisomerase IV. A DNA girase é uma enzima tetramérica composta por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelo genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Esta enzima tem um papel fundamental no processo de replicação e transcrição do DNA, participando no superenrolamento do DNA, tornando-o possível numa direcção oposta ao da dupla hélice do DNA. Este denomina-se super-enrolamento negativo (Hopkins, Davies et al. 2005).

Este processo é fundamental para a replicação do DNA na célula intacta e quando a DNA girase é inibida a replicação do DNA é também inibida (Drlica and Zhao 1997). A topoisomerase IV é uma enzima constituída também por duas subunidades A e B, mas codificada pelos genes *parC* e *parE*. Estas subunidades (ParC e ParE) apresentam grande homologia com o GyrA e GyrB respectivamente. A principal função da topoisomerase IV parece estar associada com a separação das duas cadeias que se encontram interligadas, após a replicação, (Ruiz 2003).

2.2.2 Mecanismo de Resistência

Os alvos das quinolonas são as topoisomerases do tipo II (DNA girase e topoisomerase IV). Os mecanismos clássicos envolvidos na resistência às quinolonas baseiam-se na alteração da enzima DNA girase ou na modificação da permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana (porinas). A alteração da enzima DNA girase pode ocorrer por mutação nos genes que codificam a girase e topoisomerase levando a uma alteração do local de ligação da molécula de antibiótico, impedindo-o de exercer a sua função (Hopkins, Davies et al. 2005; Li 2005).

O decréscimo de permeabilidade devido a alterações na natureza e quantidade das porinas, particularmente na OmpF, o aumento do efluxo devido a mutações nos genes reguladores de bombas de efluxo (Acr) ou ainda alterações nos seus sistemas reguladores (MexA) pode levar a um incremento na resistência a quinolonas (Nordmann and Poirel 2005).

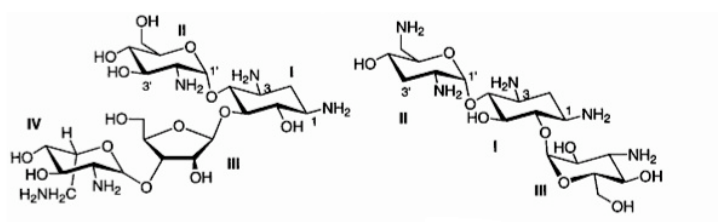
A resistência a quinolonas é maioritariamente devida a mutações cromossomais que podem inactivar o local de ligação do composto ou activar sistemas de efluxo que têm por substrato as quinolonas (Li 2005). Contudo, a resistência ao ácido nalidíxico mediada por plasmídeos foi reportada em 1987, num isolado clínico de *S. dysenteriae* (Li 2005). Em 1998, Martinez-Martinez *et al* fez uma descoberta inadvertida mas crucial aquando do estudo do plasmídeo pMG252. Este autor descreveu pela primeira vez um gene plasmídico, *qnr*, que codifica para a resistência a quinolonas (Li 2005; Nordmann and Poirel 2005; Poirel, Liard et al. 2005). Actualmente, são descritas 3 famílias de genes *qnr*: *qnrA*, o primeiro a ser descrito, o qual geralmente se encontra num ambiente genético associado a integrões de classe 1 e betalactamases de espectro alargado (Poirel, Rodriguez-Martinez et al. 2005); *qnrS*, esta variante encontra-se localizada num plasmídeo de grandes dimensões e foi já associada à beta-lactamase *bla*_{TEM-1}; e finalmente o *qnrB*, último a ser descrito, sendo também associado a elementos móveis tais como os Insertion Sequence *Common Region* (ISCR) (Li 2005).

2.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (Figura 3) constituem um grupo bastante heterogéneo quanto à sua composição química, propriedades antibacterianas e propriedades farmacológicas. Representados pela amicacina, gentamicina, netilmicina, tobramicina, são antibióticos de largo espectro utilizados habitualmente no combate a infecções causadas por bactérias de Gram positivo, nomeadamente *Staphylococcus aureus* (Kotra, Haddad et al. 2000; Magnet and Blanchard 2005).

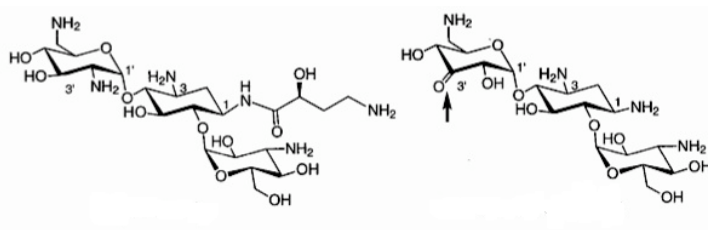
Dado o seu amplo espectro de actividade, têm sido utilizados em monoterapia, no tratamento de infecções graves. Contudo, possuem uma reduzida actividade contra estreptococos do grupo D de Lancefield, principalmente contra os enterococos (Magnet and Blanchard 2005).

Os aminoglicosídeos exibem diversas vantagens terapêuticas, nomeadamente: estabilidade metabólica, rápida acção bactericida, largo espectro de acção antibacteriana sinergismos com β -lactâmicos, e raramente se observam fenómenos de hipersensibilidade (Magnet and Blanchard 2005).



Paromomicina

Tobramicina



Amicacina

Oxo-Canamicina

Figura 3- Estrutura química de alguns aminoglicosídeos.

2.3.1 Mecanismo de Acção

Trata-se de um grupo de antibióticos que actuam ao nível da síntese proteica bacteriana, bloqueando irreversivelmente as subunidades dos ribossomas, inibindo assim a síntese proteica. Para que este efeito seja exercido ao nível do ribossoma é necessário que o antibiótico penetre pelos invólucros bacterianos (Kotra, Haddad et al. 2000).

Depois de penetrar a parede celular e a membrana, liga-se à subunidade 30 S do ribossoma levando ao erro na leitura de RNA mensageiro, provocando a morte das bactérias. O mecanismo de inibição da síntese proteica destes antibióticos tem sido estudado principalmente com a estreptomicina (Magnet and Blanchard 2005).

2.3.2 Mecanismo de Resistência

O decréscimo da concentração de aminoglicosídeo dentro da célula alvo devido à redução de absorção do composto ou à activação de mecanismos de efluxo ou ainda ambos os mecanismos em simultâneo, pode levar a uma redução na sensibilidade das bactérias a estas drogas (Magnet and Blanchard 2005).

Apesar de o mecanismo de absorção de aminoglicosídeos não ser totalmente conhecido, pensa-se que o processo envolva três etapas consecutivas: a primeira consiste na adsorção de compostos catiónicos à superfície bacteriana por interacções electrostáticas com os lipopolissacáridos negativamente carregados da parede celular das bactérias de Gram negativo; os dois passos seguintes são dependentes do potencial transmembranar resultante da cadeia respiratória, sendo o segundo caracterizado por uma taxa de absorção mais rápida (Magnet and Blanchard 2005).

Alterações nos componentes membranares envolvidos na ligação electrostática inicial dos aminoglicosídeos foi também associada a um aumento dos níveis de resistência nomeadamente em estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* (Magnet and Blanchard 2005).

3. Mecanismos de resistência aos antibióticos

As bactérias podem utilizar individualmente ou em associação vários mecanismos para impedir a acção de um determinado antibiótico, tais como: alteração do local de acção do antibiótico; diminuição da concentração intracelular do antibiótico, impedindo a sua entrada, por impermeabilização da membrana celular, ou exportando o antibiótico, através de bombas de efluxo; inactivação do antibiótico, que na maior parte dos casos ocorre por acção enzimática, sendo este o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

A resistência de um dado microrganismo a determinada droga pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida (Summers 2006).

3.1 Resistência Intrínseca

A resistência intrínseca faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, é transmitida apenas verticalmente de geração em geração, constituindo parte da herança genética do microrganismo. O maior determinante de resistência intrínseca é a presença ou ausência do alvo de acção do antibiótico (Fajardo, Martinez-Martinez et al. 2008).

Um clássico exemplo é a relação entre inibidores da síntese da parede celular, tal como as Penicilinas e o género *Mycoplasma*. Estes microrganismos não apresentam parede celular, pelo que as penicilinas não encontram neles alvo para a sua actividade (Bebear and Pereyre 2005). Este tipo de resistência não apresenta qualquer risco à terapêutica, pois é previsível, bastando conhecer-se o agente etiológico da infecção e os mecanismos de acção dos fármacos disponíveis clinicamente.

3.2 Resistência Adquirida

A resistência adquirida deve-se ao aparecimento de resistência num microrganismo que anteriormente se mostrava sensível à droga em questão. É uma "nova" característica manifestada na espécie bacteriana. Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas

cromossômicas ou extra-cromossômicas, nomeadamente pela aquisição de plasmídeos, transposões, integrões, genes de resistência, entre outros. Uma simples alteração genética pode levar ao aparecimento de um exemplar muito resistente, que normalmente não perde viabilidade nem patogenicidade (Summers 2006).

3.2.1 Transferência de genes entre bactérias

As bactérias podem trocar ou transferir DNA entre si por diferentes vias, das quais se podem destacar três, como representado na Figura 4 :

- . Transformação - envolve um processo no qual o DNA livre de uma célula no meio é incorporado por uma segunda (receptora), resultando em alterações genotípicas nesta última (Kim, Carver et al. 2006; Summers 2006);

- . Conjugação é um processo que requer contacto físico, bactéria-bactéria, em que uma das células, a dadora, transfere através de um pilus sexual o material genético para outra célula, denominada receptora (Grohmann, Muth et al. 2003; Summers 2006);

- . Transdução envolve a incorporação accidental de DNA bacteriano cromossómico ou plasmídico por um bacteriófago durante o processo de infecção celular. Após a lise celular, esse bacteriófago actua então como um vector e ao infectar a nova célula pode introduzir o DNA contendo por exemplo um gene de resistência, tornando-a assim resistente a esse composto (Zeph, Onaga et al. 1988; Summers 2006).

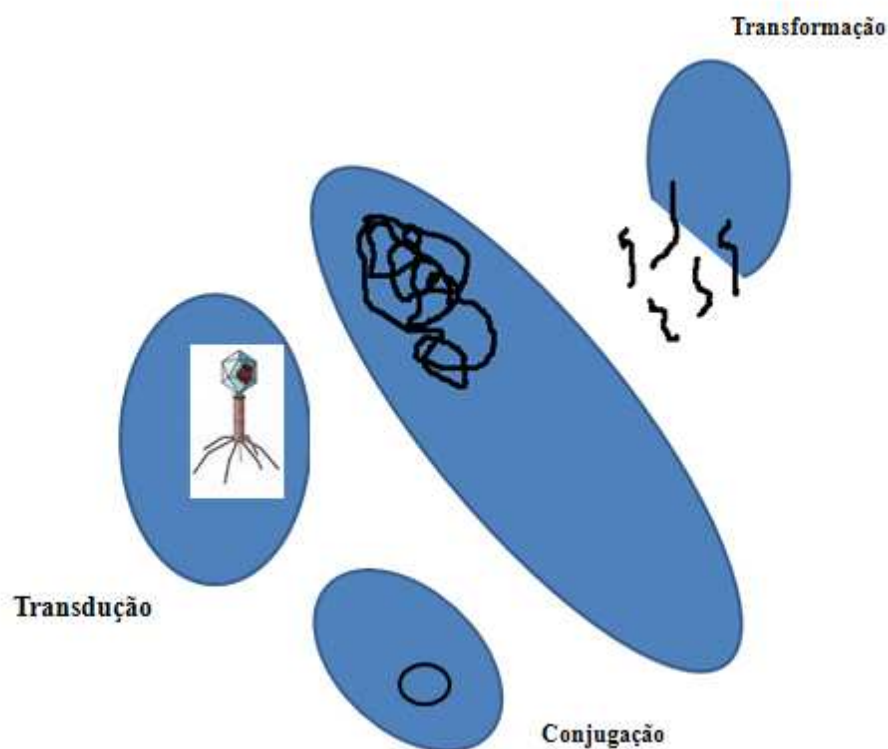


Figura 4 – Representação esquemática dos diferentes mecanismos de transferência horizontal de genes entre bactérias.

3.2.2 Elementos genéticos móveis associados à resistência a antibióticos: Plasmídeos, sequências de inserção, transposões e integrões

Plasmídeos são moléculas circulares de DNA de cadeia dupla, extracromossomais, que possuem a capacidade de replicação autónoma. Os plasmídeos geralmente são importantes veículos de transporte e mobilidade de genes que, em alguns casos, permitem à bactéria uma melhor adaptação ao ambiente que colonizam ou em que se encontram (Summers 2006).

A incorporação destes plasmídeos, contendo genes de resistência a antibióticos pode conduzir à expressão destes genes noutra célula, tornando-a resistente a esses

antibióticos. A capacidade conjugativa de uma bactéria é normalmente codificada em plasmídeos, designados plasmídeos F, de fertilidade ou conjugativos. Estes plasmídeos conferem à bactéria a capacidade de estabelecer contacto com outras bactérias, por meio de um tubo de conjugação (Pilus sexual) para a transferência de genes plasmídicos (Summers 2006).

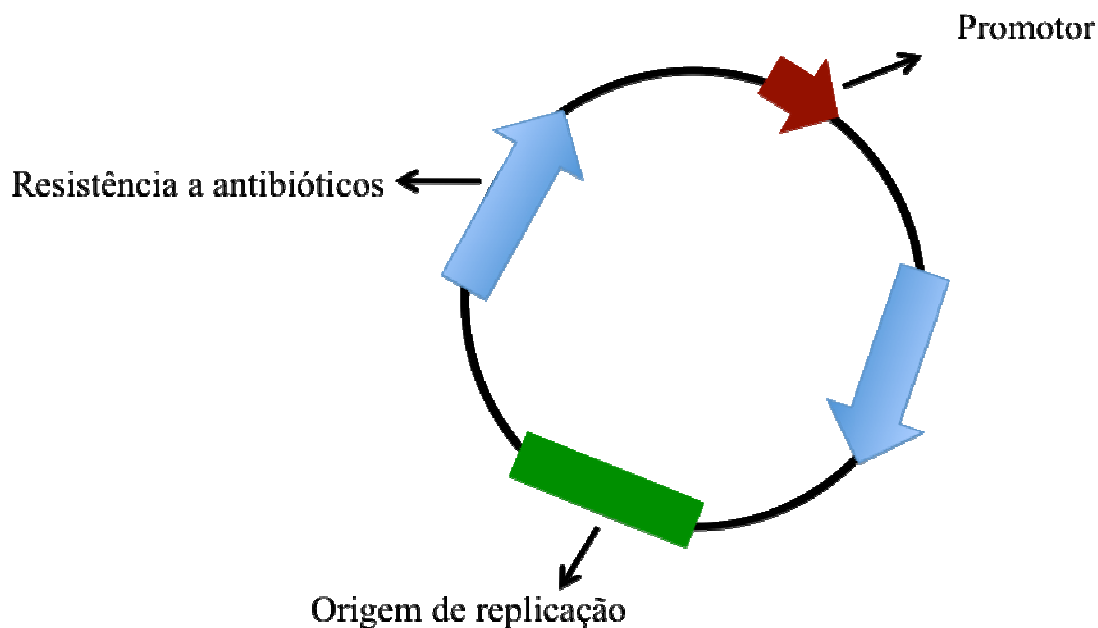


Figura 5- Representação esquemática de um plasmídeo incluindo 3 regiões: região promotora, resistência a antibióticos e origem de replicação.

As **sequências de inserção (IS)** são os elementos genéticos transponíveis mais simples, não estando, por si só, associadas a resistência a antibióticos. O seu comprimento varia entre 750 a 1500 pares de bases. São constituídas por um gene que codifica a enzima transposase, flanqueado por curtas sequências nucleotídicas invertidas (IR) nos extremos (Martinez and Baquero 2002).

A transposase reconhece as sequências invertidas e repetições idênticas noutros locais do cromossoma, fazendo a excisão e a inserção destes fragmentos de DNA para um novo local, promovendo a transferência de genes de resistência a antibióticos. Estas sequências de inserção podem actuar como promotores fortes para a expressão de genes de resistência, sendo o caso da *ISab_{al}*, em *Acinetobacter baumannii*, responsável pela

sobre-expressão da oxacilinase *bla_{oxa40}* (Walsh 2006), e a *ISEcp1*, em Enterobactérias geralmente presente a montante de *bla_{CTX-M}*; ou permitir a sua mobilização, como é o caso de *ISCR*, as quais são um tipo particular de sequências de inserção, uma vez que não possuem uma transposase. Neste caso, o processo de transposição é feito em círculo rolante (Toleman, Bennett et al. 2006; Villegas, Kattan et al. 2007).

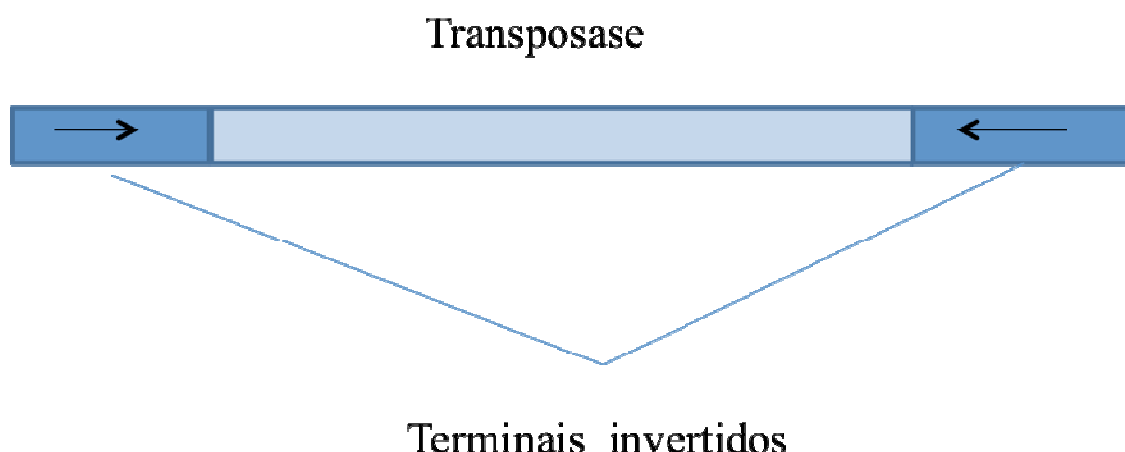


Figura 6- Representação esquemática de uma sequência de inserção.

Os **Transposões** são elementos genéticos móveis de maior dimensão constituídos por duas sequências de inserção (IS) que flanqueiam um ou mais genes que este transporta.

Os transposões inserem-se aleatoriamente no genoma sendo a transposição o mecanismo que descreve a transferência de segmentos cromossomais, de uma posição para outra (Summers 2006). Conhecem-se dois mecanismos de transposição:

- . Replicativa, na qual se forma uma cópia do elemento transponível. Uma das cópias permanece no sítio original e uma cópia move-se e insere-se num novo local
- . Conservativa em que o elemento original se excisa, movendo-se para um outro local.

Os transposões podem conter genes de resistência a antibióticos e transferir-se para uma nova posição no cromossoma ou para um plasmídeo.

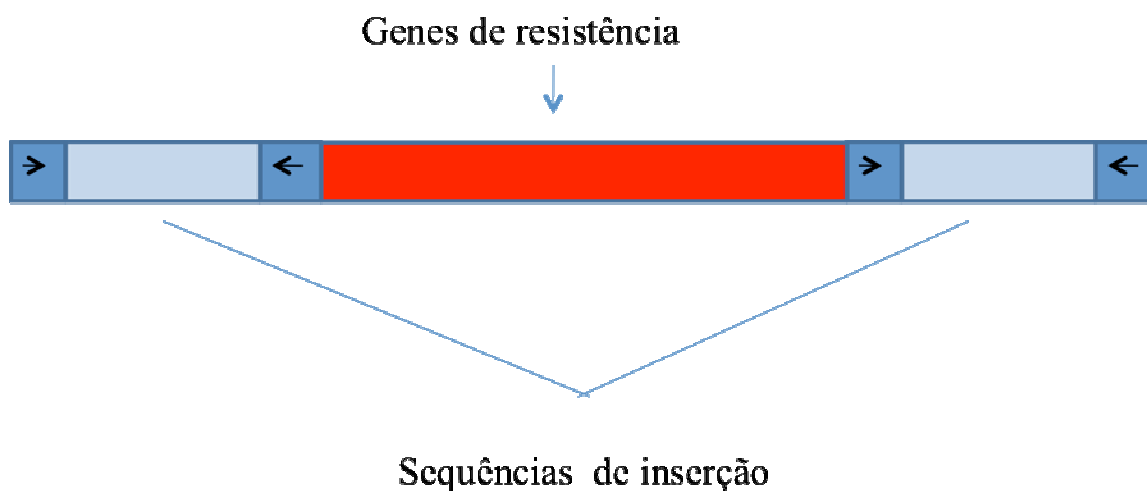


Figura 7- Representação esquemática da estrutura de um transposão.

Integrões, descritos em 1989 por Hall e colaboradores, são elementos genéticos capazes de capturar e expressar genes de resistência aos antibióticos. Fazem parte da estrutura básica do integrão o gene *intI* que codifica a enzima integrase e o local *attI*, local de recombinação do integrão com as cassetes genéticas, constituindo o segmento conservado 5' (5'SC).

Entre *intI* e *attI* encontram-se os promotores divergentes P1 para a expressão de *intI* e Pc' para a expressão das cassetes de genes inseridas na zona variável do integrão. A enzima *intI* permite a interação entre *attI* e o local *attC* das cassetes de genes, unindo ambos os sítios e facilitando a integração e a excisão das cassetes de resistência na zona variável do integrão (Schmitz, Hafner et al. 2001; Summers 2006).

De acordo com a sequência nucleotídica do gene *intI* existem várias classes de integrões nomeadamente, classe 1,2 e 3. As diferenças entre as diversas classes estão relacionadas com o gene que codifica a integrase (Barlow, Pemberton et al. 2004). Dentro das várias classes identificadas, os integrões de classe 1 são os mais frequentes em Enterobacteriaceae, representando elementos genéticos muito importantes na disseminação, aquisição e expressão de genes de resistência (Machado, Canton et al. 2005).

A maioria dos integrões são compostos por um extremo 3' altamente conservado (3'CS) constituído pelos genes *qacEAI* e *sulI* que codificam, respectivamente, a

resistência a compostos de amônio quaternário, brometo de etídio e a sulfonamidas. Entre os extremos 5'CS e 3'CS encontra-se uma zona variável com a presença ou ausência de cassetes de genes de resistência a antibióticos.

Os integrões de classe 4, também denominados super-integrões, foram encontrados no genoma do *Vibrio cholerae* (A. C. Fluit 2004). Trata-se de uma classe distinta a qual não está habitualmente associada à presença de genes que conferem resistência a antibióticos (White, McIver et al. 2001).

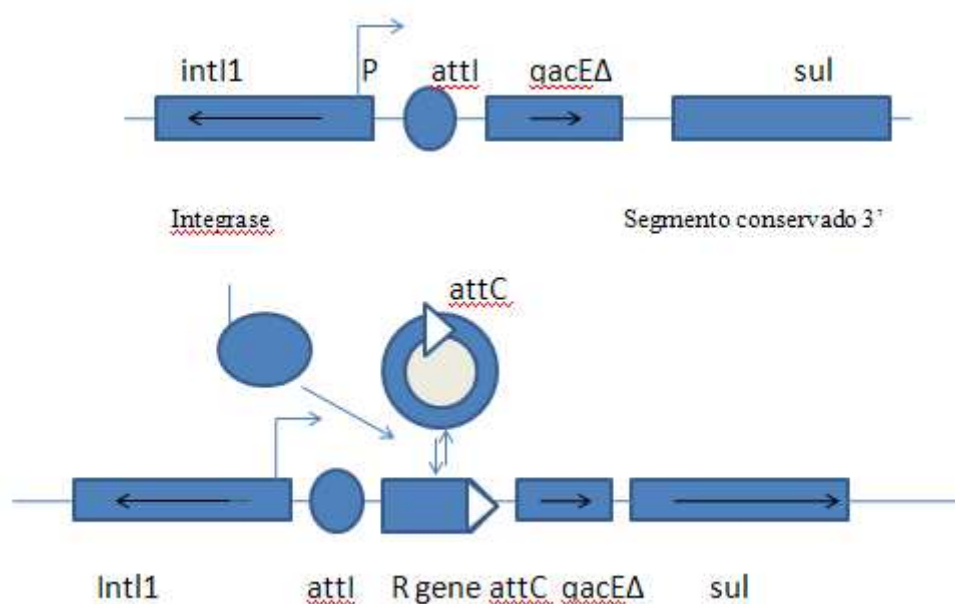


Figura 8– Representação esquemática da estrutura de um integrão e do mecanismo de inserção das cassetes de genes de resistência.

4. β -lactamases

Em bactérias de Gram negativo, a produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais importante, contra agentes β -lactâmicos, sendo que a sua utilidade tem sido comprometida pela presença crescente de β -lactamases em estirpes de origem clínica (Mendonça, Leitao et al. 2007). As β -lactamases formam um grande grupo de

enzimas, capazes de hidrolizar o anel β -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (antibióticos β -lactâmicos), tornando-os inativos (Smet, Martel et al. 2008). Dentro das β -lactamases, destacam-se as β -lactamases de espectro alargado (Extended Spectrum β -lactamase - ESBL) sendo a maior parte das ESBL resultantes de mutações ocorridas nas β -lactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Pitout, Nordmann *et al.* 2005) O termo β -lactamase de espectro alargado refere-se às β -lactamases que apresentam resistência aos β -lactâmicos de largo espectro, os quais normalmente são activos contra os bacilos de Gram negativo.

Atendendo à grande diversidade de enzimas produzidas, vários sistemas de classificação foram propostos. As classificações mais utilizadas são a de Ambler, que classifica a enzima de acordo com a estrutura molecular e a de Bush, Jacoby e Medeiros que considera também a afinidade pelo substrato e a sua susceptibilidade aos inibidores das β -lactamases (Smet, Martel et al. 2008).

Tabela1: Classificação de β -lactamases

Bush-Jacoby-Medeiros group	Ambler	Enzimas representativas	Substratos preferenciais	Inibidas por		Microrganismos	Localização
	class ²	(exemplos)		CA ³	EDTA ⁴		
1	C	AmpC	Cefalosporinas	-	-	Bacilos de Gram-negativo	Cromossoma (Plasmídeo)
2 ^a	A	PC1	Penicilinas	+	-	Cocos de Gram-positivo	Plasmídeo
2b	A	TEM-1, 2	Penicilinas	+	-	Bacilos e Cocos de Gram-negativo	Plasmídeo
		SHV-1	Cefalosporinas				Cromossoma
2be	A	TEM-derivates	Penicilinas de espectro reduzido e Cefalosporinas de largo espectro	+	-	Bacilos de Gram-negativo	Plasmídeo
		SHV-derivates		±	-	<i>P.aeruginosa</i> <i>P.aeruginosa</i>	Cromossoma
		CTX-M-1-26				<i>K.oxytoca</i> <i>Acinetobacter spp</i>	Plasmídeo
		PER GES-1 OXY-1/2 (K1)		-	-		
	D	OXA-11,14,16,17				<i>P.aeruginosa</i>	
2br	A	TEM-30-36,	Penicilinas	±	-	<i>E.coli</i> ,	Plasmídeo

		TRC-1, SHV-49				<i>K.pneumoniae</i> (resistentes aos inibidores)	
2c	A	PSE-1,3 4 BRO-1-3	Penicilinas carbenicilina	+	-	<i>P.aeruginosa</i> <i>A.baumanii</i> <i>M.catarrhalis</i>	Variável
2d	D	OXA-1-10 PSE-2	Penicilinas cloxacilina	±	-	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P.aeruginosa</i>	Variável
2e	A	CepA FPM-1 L2	Cefalosporinas	+	-	<i>Bacteroides sp</i> <i>Proteus sp</i> <i>S.maltophilia</i> (indutível)	Variável
2f	A D	NMC-A Sme-1-3 Imi-1-3 KPC-1,2 GES-2 OXA-24-26,40, 51,58,72	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenemos	+		<i>E.cloacae</i> <i>S.marcescens</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>A.baumanii</i>	Cromossoma Plasmídeo Plasmídeo Cromossoma
3	B	VIM, IMP, SPM, GIM L1 CcrA	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenemos	-	+	<i>P.aeruginosa</i> <i>A.species</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>S.maltophilia</i> <i>Bacteroides sp</i>	Variável

¹Classificação funcional baseada no substracto ² Classificação estrutural baseada na similaridade das sequências de aminoácidos. ³CA, Ácido clavulânico (para a inibição de actividade de β -lactamase.) ⁴EDTA, quelante do metal (para a inactivação de enzimas dependentes do zinco.

De acordo com a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush, Jacoby et al. 1995), o grupo 1 é formado por cefalosporinases que não sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também pertencentes à classe molecular C. Como exemplo, as Amp C, são enzimas mais sensíveis à inibição pelo sulbactam. Em algumas espécies estas β -lactamases são produzidas em níveis muito baixos, contudo, a sua indução pode ocorrer na presença de β -lactâmicos. O grupo 2 compreende penicilinases, cefalosporinases, ou ambas, que sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também pertencentes às classes moleculares A e D. Nesta classe estão incluídas as primeiras β -lactamases isoladas (TEM-1 e SHV-1) (Walther-Rasmussen and Hoiby 2007). Contudo, devido ao numeroso aparecimento de ESBLs mutantes, foram criadas duas sub-classes: 2a e 2b. A sub-classe 2a contém apenas penicilinases clássicas das bactérias de Gram positivo. A

sub-classe 2b contém β -lactamases de espectro alargado, e com a capacidade de inactivação tanto de penicilinas como de cefalosporinas.

A TEM-1 é a β -lactamase mais frequente em bactérias de Gram negativo e foi a primeira enzima plasmídica, descrita nos anos 60, em *Escherichia coli*. A facilidade de transmissão mediada por plasmídeos facilitou a sua disseminação para outras espécies bacterianas. A TEM-2 deriva da TEM-1 por substituição de um aminoácido. A TEM-3, identificada em 1983, foi a primeira ESBL a ser descrita, existindo actualmente 133 enzimas, as quais derivam das parentais TEM-1 e TEM-2, por variação num número ilimitado de aminoácidos (Walther-Rasmussen and Hoiby 2007).

Com o passar dos anos, surgiu a necessidade da criação de novos subgrupos, segregados do subgrupo 2b: os grupos 2be e 2br. No subgrupo 2be, a letra “e” significa amplo espectro de actividade e representa as β -lactamases capazes de inactivar as cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima), assim como os monobactams (aztreonam). Um dos exemplos, são as CTX-M, enzimas mediadas por plasmídeos, que hidrolisam preferencialmente a cefotaxima e apresentam apenas 40% de homologia com o grupo TEM. A sua primeira descrição ocorreu em 1990, numa estirpe de *E. coli*. Podem ter origem evolutiva em enzimas do tipo AmpC cromossómicas de *Kluyvera ascorbata*, com as quais apresentam grande homologia (Perez-Perez and Hanson 2002; Walsh 2006).

Estudos filogenéticos dessa família mostram que existem cinco grandes grupos baseados nas sequências de aminoácidos (Coque 2006):

- . O grupo I - inclui CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-10 a 12; CTX-M-15; CTX-M-22; CTX-M-23 e CTX-M-28 a 30;
- . O grupo II - inclui CTX-M-2; CTX-M-4 a 7; CTX-M-20 e Toho-1;
- . O grupo III - inclui CTX-M-8;
- . O grupo IV CTX-M-9; CTX-M-13; CTX-M-14; CTX-M-16; CTX-M-19; CTX-M-21; CTX-M-27 e Toho-2;
- . O grupo V CTX-M-25 e 26.

Os membros do mesmo grupo exibem similaridade superior a 94% nas sequências de aminoácidos, enquanto que, entre grupos diferentes a semelhança é menor que 90%. A distância evolutiva entre os grupos sugere evolução a partir de

ancestrais diferentes (Coque 2006). A associação das *bla*_{CTX-M} à sequência de inserção *ISEcp1* tem sido demonstrada em vários estudos (Coque 2006; Walsh 2006).

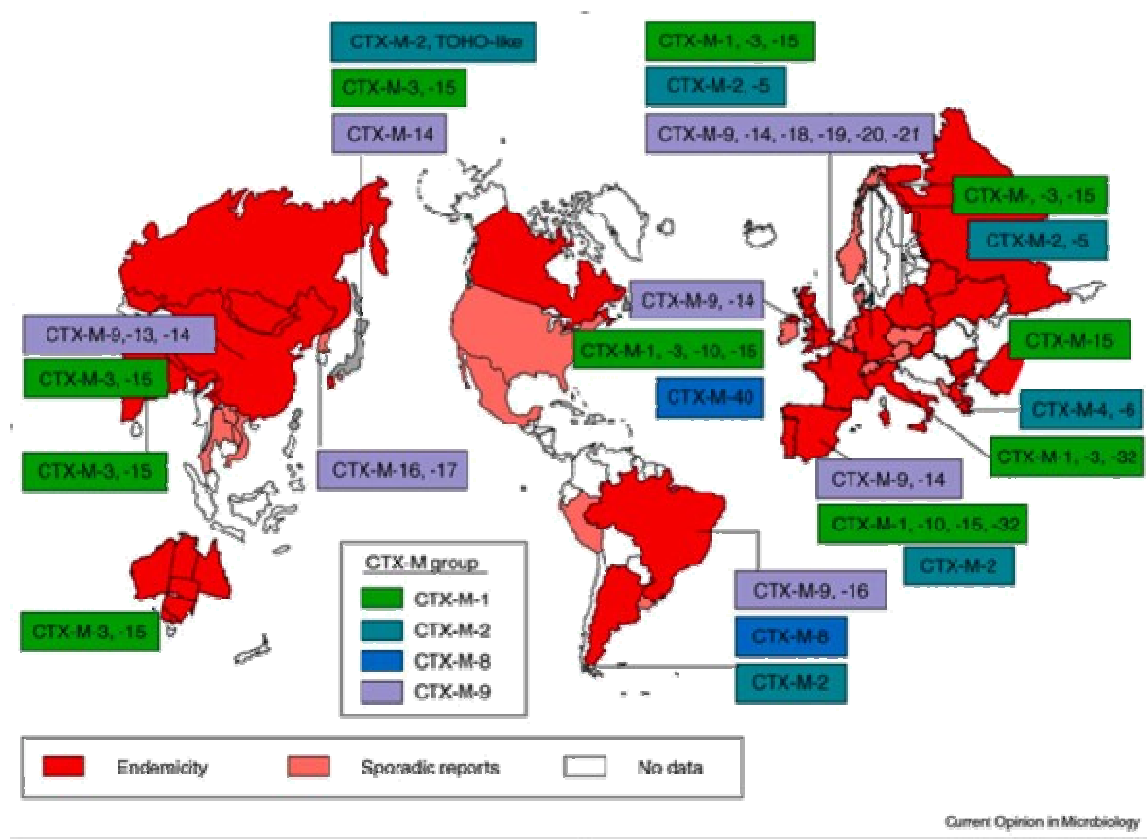


Figura 9 – Distribuição geográfica, a nível mundial, dos diferentes grupos de CTX-M. (adaptado de Coque *et al*, 2006)

No subgrupo 2br, a letra “r” denota a reduzida ligação aos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico e sulbactam); são também conhecidas como ESBLs resistentes aos inibidores de β -lactamases (derivadas da TEM). Algumas ainda se mantêm susceptíveis ao tazobactam.

Existe, ainda, o subgrupo 2c, o qual foi separado do subgrupo 2b, por estas enzimas inativarem a carbenicilina, com maior afinidade do que a benzilpenicilina, e com pequeno efeito sobre a cloxacilina.

O subgrupo 2d inactiva a cloxacilina com mais afinidade do que a benzilpenicilina, e com pequeno efeito sobre a carbenicilina, para além de serem fracamente inibidas pelos inibidores das β -lactamases. Como exemplo, as OXA,

encontradas em *E. coli*, *K. pneumoniae* e outras enterobactérias, mas predominantemente em *P. aeruginosa*.

O subgrupo 2e inclui cefalosporinases que podem também hidrolisar os monobactâmicos e são inibidas pelo ácido clavulânico.

Além disso, o subgrupo 2f foi adicionado, por tratar-se de enzimas classificadas como “Serina-beta-lactamases”, em contraste com as “Zinco-beta-lactamases”, incluídas no grupo 3.

O grupo 3 inclui enzimas que possuem no seu local activo Zinco (Zn), e por esse motivo se denominam “Zinco-beta-lactamases” ou simplesmente “Metallo-beta-lactamases”, e correspondem à classe molecular B (Walsh, Toleman et al. 2005).

Por último, o grupo 4 inclui as penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico, e ainda não possuem grupo molecular definido.

5. Tipagem bacteriana

A tipagem permite caracterizar a diversidade dos microrganismos existentes na Natureza, contribuindo assim para a sua classificação e para a discriminação entre indivíduos de espécies diferentes ou de uma mesma espécie (Figura 10). A tipagem de microrganismos progrediu consideravelmente nos últimos anos como resultado do desenvolvimento de técnicas moleculares que fazem uso das diferenças encontradas ao nível do seu genoma (Singh, Goering et al. 2006).

O advento da tipagem molecular permitiu não só grandes avanços nos domínios da identificação, classificação e diagnóstico, mas também no estudo da evolução e filogenia dos microrganismos. Antes do desenvolvimento das diversas técnicas de tipagem molecular, os procedimentos que permitiam distinguir entre isolados bacterianos baseavam-se principalmente na comparação fenotípica, ou seja, em características observáveis (Singh, Goering et al. 2006). Os métodos fenotípicos de tipagem recorrem a testes morfológicos e bioquímicos, sensibilidade a fagos, sensibilidade a bacteriocinas, perfis imunológicos e perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Apesar da sua grande utilidade na determinação do género e da espécie, a aplicabilidade destes métodos na tipagem ao nível da sub-espécie (conjunto de estirpes) é muito limitada (Singh, Goering et al. 2006).

Pelo contrário, macromoléculas como os ácidos nucleicos e as proteínas contêm informação e diversidade suficiente nas suas sequências para permitirem uma abordagem uniforme e simples com vista ao estudo da diversidade microbiológica.

A análise de proteínas, embora tenha vindo a ser utilizada com algum sucesso para tipagem, apresenta também a limitação de apreciar a expressão de genes na dependência das condições ambientais, enquanto que a informação correspondente ao genótipo não é afectada por modificações ambientais e fisiológicas. Por este motivo são utilizados predominantemente métodos de tipagem baseados na análise de ácidos nucleicos (Singh, Goering et al. 2006).

Os métodos de tipagem molecular analisam uma parte ou a totalidade do genoma, sendo conhecidos como métodos de genotipagem. Baseiam-se no polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados a partir do genoma de diversos organismos em comparação (Singh, Goering et al. 2006). A tipagem molecular, baseada na análise de ácidos nucleicos pode ser dividida essencialmente em:

1. Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico, de que é exemplo a análise por electroforese em Campo Pulsado (PFGE).
2. Técnicas de tipagem baseadas em PCR

Em qualquer um dos casos, o que se pretende obter é um padrão de fragmentos de DNA, específico para cada isolado que permita fazer, de forma simples, a sua distinção.

5.1 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico

O cromossoma bacteriano é o componente fundamental de identidade da célula e por esse motivo é o mais utilizado para inferir sobre a relação existente entre diferentes bactérias. Uma das abordagens utilizadas consiste na digestão do DNA total com enzimas de restrição, resultando numa série de fragmentos de diferentes tamanhos que formam diferentes padrões quando separados num gel de agarose. Esta diferença nos padrões de restrição designa-se polimorfismos no tamanho de fragmentos de restrição

ou RFLPs (Singh, Goering et al. 2006). Contudo, esta técnica apresenta algumas desvantagens, uma vez que o tamanho dos fragmentos obtidos pode ser demasiado grande para poder ser convenientemente separado numa electroforese convencional onde, fragmentos com tamanho superior a 40 Kb não migram eficientemente. Assim, a electroforese em campo pulsado (PFGE), em que a direcção do campo eléctrico, no qual o DNA está a ser separado, vai alternando periodicamente, apresenta resultados mais satisfatórios, permitindo a separação de fragmentos de tamanho superior a 1000 Kb (Singh, Goering et al. 2006).

5.2 Técnicas de Tipagem baseadas em PCR

A técnica rep-PCR faz uso de sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas, muito conservadas, e presentes em numerosas cópias no genoma da maioria das bactérias de Gram negativo.

Estão identificadas três famílias de sequências repetitivas (Versalovic, Koeuth et al. 1991):

- . REP (“Repetitive Extragenic Palindromic elements”) com 35-40 pares de bases, as quais são conservadas em várias espécies bacterianas;

- . ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements”) de 124-127 pares de bases, as quais contêm um elemento repetitivo central invertido altamente conservado e que estão localizados nas regiões extragénicas do genoma bacteriano;

- . BOX de 154 pares de bases. O conjunto destas 3 técnicas designa-se genericamente por rep-PCR.



Figura 10- Resolução relativa das várias técnicas de tipagem molecular (adaptado de Rademaker *et al.*, 1997).

5.2 Aplicações

A tipagem molecular, muito importante em estudos de biodiversidade, encontra ainda aplicações em Microbiologia Clínica, nomeadamente em Epidemiologia, dada a sua capacidade para esclarecer a origem e disseminação de uma estirpe causadora de um surto infeccioso (Singh, Goering *et al.* 2006).

Os resultados da tipagem molecular permitem entre outros, observar a disseminação de bactérias multirresistentes aos antibióticos intra e inter-hospitalar e detectar surtos causados por estas bactérias. De facto, estes resultam frequentemente da exposição a uma fonte comum do agente etiológico e da sua disseminação rápida entre a população potencialmente hospedeira (Singh, Goering *et al.* 2006).

Organismos geneticamente relacionados partilham características genéticas, bioquímicas e, muitas vezes, factores de virulência. Assim, em Epidemiologia, o processo de tipagem é crítico, quer na identificação de surtos infecciosos e de episódios

de transmissão cruzada de patogênicos nosocomiais, quer no reconhecimento da fonte de contaminação e de estirpes particularmente infecciosas.

OBJECTIVOS

Escherichia coli é o principal Gram negativo causador de infecções do tracto urinário. O uso contínuo e imprudente de agentes antimicrobianos levou ao aparecimento de diversas situações de crise epidemiológica causadas por este agente, em ambiente hospitalar. O presente estudo teve como principais objectivos:

- 1) Identificar determinantes genéticos de resistência a antibióticos em isolados clínicos de *E. coli*;
- 2) Caracterizar o ambiente genético associado aos determinantes genéticos de resistência encontrados;
- 3) Avaliar a prevalência de ESBL e de estirpes multirresistentes nos isolados em estudo;
- 4) Contribuir para compreensão dos mecanismos de resistência aos β – lactâmicos;
- 5) Estudar a variabilidade genética dos 100 isolados por rep-PCR

Material e Métodos

1. Isolados bacterianos

Foram recolhidos 100 isolados de *E. coli* entre Dezembro de 2007 e Fevereiro de 2008. Os isolados eram provenientes de vários Serviços do Hospital Infante D. Pedro – Aveiro. A identificação dos isolados foi efectuada com o sistema automatizado de identificação bacteriana, Vitek 2 compact, na secção de Microbiologia do referido hospital

Os isolados foram obtidos de diversos produtos biológicos: urina (n=81), hemocultura (n=8) e outros produtos (n=11), incluindo exsudatos e expectoração.

A conservação das estirpes foi feita em placas de TSA, armazenadas a 4°C e por congelamento a -70°C, em caldo nutritivo adicionado de 10% de glicerol (Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

2. Identificação e susceptibilidade dos isolados de *E. coli*

2.1 Identificação-Coloração de Gram

A coloração de Gram, uma técnica clássica muito utilizada em laboratórios de microbiologia, é o ponto de partida para a identificação de um microrganismo e consequente diagnóstico. Esta é uma coloração diferencial, que se baseia nas diferenças estruturais das paredes celulares bacterianas, permitindo a divisão das bactérias em dois grandes grupos: bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (Figura 11).

As bactérias de Gram positivo possuem uma camada espessa de peptidoglicano (cerca de 70%) exterior à membrana plasmática. Pelo contrário, as bactérias de Gram negativo apresentam uma parede celular mais complexa, possuindo uma camada fina de peptidoglicano (1-5%) exterior à membrana plasmática. Nestas, existe ainda uma membrana externa.

Este procedimento permite ainda uma melhor visualização da forma das células bacterianas.

COLORAÇÃO DE GRAM

1. Corar os esfregaços fixados com uma gota de violeta de cristal aplicada durante 60 segundos. Lavar com água corrente.
2. Inundar com solução de Lugol durante 60 segundos. Lavar com água corrente.
3. Descorar com álcool-acetona a 96 % durante 30 segundos, agitando suavemente.
4. Corar com a solução de fucsina diluída a 0,25 % durante 30 segundos. Lavar com água corrente.
5. Observar ao microscópio óptico com objectiva de imersão (100 x).

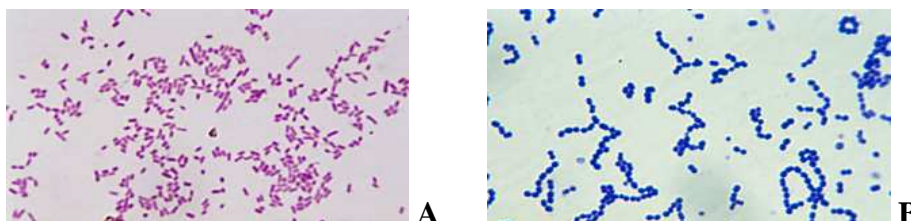


Figura 11: Coloração de Gram: bactérias de Gram negativo (A) e bactérias de Gram positivo (B).

2.2 Sistema VITEK2 compact

Os isolados recolhidos, após obtenção em cultura pura e respectivo Gram, foram identificados no sistema VITEK2 Compact. A susceptibilidade dos isolados clínicos de *E. coli* às diferentes classes de antibióticos foi também realizada no sistema VITEK2 compact AES.

Os agentes antimicrobianos testados com a utilização da carta N060 foram: Ampicilina, Amoxicilina/Ác. Clavulânico, Piperacilina/Tazobactam, Cefalotina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepime, Meropenem, Amicacina, Gentamicina, Tobramicina, Levofloxacina, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Nitrofurantoína, Trimetoprim/Sulfonamidas e Tetraciclina.

Após 18-20h de incubação a 37°C, preparou-se uma suspensão, partindo de uma cultura pura, em meio salino, com uma densidade equivalente a 0,5 na escala de MacFarland. Procedeu-se à inoculação das galerias de identificação (GN) e do respectivo teste de sensibilidade aos antimicrobianos (N060), as quais foram incubadas 18 horas.

2.3 Determinação da concentração inibitória mínima

O método de E-test® (AB Biodisk) foi aplicado para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos seguintes antibióticos: imipenemo, ertapenemo e tigeciclina. Este método baseia-se no uso de tiras impregnadas com um gradiente exponencial de antibiótico. A interpretação do resultado é feita com base na observação da elipse de inibição de crescimento produzida ao fim de um período de incubação de 18 horas. O valor da CIM corresponde à concentração presente no local onde a elipse intercepta a tira.

2.4 Detecção de β -lactamases de espectro alargado.

A pesquisa de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) foi inicialmente efectuada nos 100 isolados pelo sistema VITEK2 compact AES e posteriormente confirmados os positivos pelo método de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia).

O teste de sinergismo é de fácil interpretação. Assim, foram utilizadas duas tiras de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia) disponíveis comercialmente para a detecção de ESBL. Uma das tiras contém concentrações crescentes de ceftazidima (0,5µg/ml a 32µg/ml) numa das extremidades e concentrações crescentes de ceftazidima (0,064µg/ml a 4µg/ml) associadas a uma concentração fixa (4µg/ml) de ácido clavulânico na outra extremidade. A outra tira utilizada contém cefotaxima em concentrações crescentes (0,25µg/ml a 16µg/ml) numa das extremidades e, na outra extremidade, concentrações crescentes de cefotaxima (0,16µg/ml a 1µg/ml) associadas a uma concentração fixa de ácido clavulânico (4µg/ml). Uma amostra é considerada produtora de ESBL quando ocorre redução da concentração inibitória mínima de ceftazidima ≥ 3 diluições logarítmicas na presença de ácido clavulânico em comparação com a CIM de ceftazidima sem o mesmo (16), ou seja, quando a razão entre a CMI do antimicrobiano testado e a CIM do antimicrobiano associado ao ácido clavulânico for ≥ 8 . Em casos onde ambas as CIMs apresentaram valores abaixo dos gradientes de antimicrobianos presentes na fita, a redução foi considerada zero e o teste, negativo. Por outro lado, o teste foi considerado indeterminado quando ambas as CIMs se encontravam acima da escala da fita, impossibilitando assim o cálculo da redução da CIM.

A partir de uma cultura bacteriana com 18 a 20h de incubação a 37°C, fez-se uma suspensão com água bidestilada estéril com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland. Inoculou-se em placas de Petri com gelose de Mueller Hinton (Oxoid), semeando com zaragatoa. Amostras da American Type Culture Collection (ATCC), *K. pneumoniae* ATCC 700603 produtora de ESBL e *E. coli* ATCC 25922 não-produtora de ESBL, foram utilizadas como controlo de qualidade para todos os testes de sensibilidade realizados neste estudo. As estirpes ATCC foram avaliadas seguindo a padronização do CLSI sendo a interpretação dos resultados avaliada de acordo com os limites preconizados para cada uma das estirpes ATCC.

3. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

De uma cultura com um período de incubação a 37 °C de 18-24H, em gelose tripticase soja (BioMérieux, Marcy L'Étoile, França), retiraram-se duas colónias, que se suspenderam em 200µL de água destilada estéril. Desta suspensão foi retirado 1 ul para a reacção de PCR. Todas as reacções de PCR foram preparadas para um volume final de 50 µL e decorreram num termociclador modelo Thermo Hybaid® PxE. 0,2.

Tabela 2: Indicação da concentração final dos componentes da reacção de PCR. O tampão referenciado possui sulfato de amónia (NH₄)₂SO₄. Foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) para uma melhor desnaturação do DNA.

Reagentes	Concentração final	Volume (µL)
25 mM MgCl ₂	3,0 mM	6,0
5 x Tampão	1 x	2,5
2 mM dNTP mix	0,2 mM de cada	5,0
DMSO	5 %	2,5
Iniciador 1	0,3 pmol/µl	1,5
Iniciador 2	0,3 pmol/µl	1,5
DNA total	Variável	variável
Taq (1 U µL ⁻¹)	1 U	1,0
dH ₂ O	-	para perfazer um volume de 50,0 µL

3.1 Pesquisa de β -lactamases do tipo OXA, TEM, CTX-M

Todas as amostras foram sujeitas à pesquisa de genes que codificam as β -lactamases TEM, OXA e CTX-M por PCR. Os oligonucleótidos iniciadores utilizados, para a amplificação de cada gene, assim como as condições utilizadas nas reacções de PCR, estão descritos nas tabelas abaixo.

Tabela 3: Sequência dos iniciadores para pesquisa das diferentes famílias de β -lactamases, tamanho do respectivo amplicão e respectiva referência.

Designação do Iniciador	Sequência	Gene alvo	Tamanho do fragmento	Referência
TEM-F	5'-AAAGATGCTGAAGATCA-3'	<i>bla</i> _{TEM}	425 pb	(Henriques, Fonseca et al. 2006)
TEM -R	5'-TTTGGTATGGCTTCATTC-3'			
TEM - F	5'-TTACCAATGCTTAATCA-3'	<i>bla</i> _{TEM}	1076 pb	(Coque, Oliver et al. 2002)
TEM - R	5'-CTCGTCGTTTGGTATGGC-3'			
CTX – F	5'-GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG-3'	<i>bla</i> _{CTX-M}	400 pb	(Henriques, Fonseca et al. 2006)
CTX – R	5'-CGCAATATCATTGGTGGTGCC-3'			
OXA – F	5'-ACACAATACATATCAACTTCGC-3'	<i>bla</i> _{OXA}	814 pb	(Henriques, Fonseca et al. 2006)
OXA – R	5'-AGTGTGTTTAGAATGGTGATC-3'			

Tabela 4: Condições utilizadas nas reacções de amplificação das diferentes famílias de β -lactamases.

Etapas	Programa					
	TEM		OXA		CTX-M	
Desnaturação inicial	94 ° C	4 ‘	94 ° C	4 ‘	94 ° C	4 ‘
Desnaturação	94 ° C	30 ‘‘	94 ° C	30 ‘‘	94 ° C	30 ‘‘
Hibridação dos primers	44 ° C	30 ‘‘	53 ° C	30 ‘‘	55 ° C	30 ‘‘
Síntese	72 ° C	45 ‘‘	72 ° C	45 ‘‘	72 ° C	45 ‘‘
Ciclos	30 Vezes		30 Vezes		30 Vezes	
Síntese final	72 ° C	5 ‘	72 ° C	5 ‘	72 ° C	5 ‘
Após reacção	15 ° C	∞	15 ° C	∞	15 ° C	∞

3.2. Pesquisa de Integrões

Para a pesquisa de integrões de classe 1 utilizaram-se os iniciadores que estão descritos na tabela 5. Na tabela 6, indicam-se as condições das reacções de amplificação.

Tabela 5 : Sequência dos iniciadores para pesquisa do gene codificante da integrase de classe 1, das zonas variáveis, tamanho dos respectivos amplicões e referência.

Designação do primer	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência
HS 463a	5'-CTGGATTTTCGATCACGGCACG-3'	<i>IntI 1</i>	500 bp	(Barlow, Pemberton et al. 2004)
HS 464	5'-ACATGCGTGTAATCATCGTCG-3'			
RB 317	5'-GAACCTTGACCGAACGCAG-3'	<i>Zv 1</i>	Variável	(Barlow, Pemberton et al. 2004)
RB 320	5'-AGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAG-3'			

Tabela 6: Condições utilizadas nas reacções de amplificação de integrases de classe 1 e respectivas zonas variáveis.

Fases do PCR	Programa			
	Integrase IntI1		Zona variável 1	
Desnaturação inicial	94 ° C	4 ‘	94 ° C	4 ‘
Desnaturação	94 ° C	30 ‘‘	94 ° C	30 ‘‘
Hibridação dos primers	65 ° C	30 ‘‘	59 ° C	30 ‘‘
Síntese	72 ° C	45 ‘‘	72 ° C	3 ‘ 30 ‘‘
Ciclos	30 Vezes		30 Vezes	
Síntese final	72 ° C	5 ‘	72 ° C	10 ‘
Após reacção	15 ° C	∞	15 ° C	∞

4 . Electroforese em gel de agarose e visualização do DNA

Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (Amersham, Uppsala, Suécia), com uma concentração de 1%, em tampão (TAE) 1X, ao qual se adicionou brometo de etídio a uma concentração final de 10mg/ml. O volume de amostra aplicado no gel foi 1/10 do volume de reacção, ao qual se adicionou tampão de carga 1x concentrado.

A electroforese decorreu a 80V, durante 1 hora e 30 minutos, em tampão TAE 1X.

Em todas as electroforeses efectuadas, foram introduzidos marcadores de peso molecular de DNA. O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por comparação com a migração dos de fragmentos de peso molecular conhecido (Southern, 1975). No presente trabalho foram utilizados os seguintes marcadores: lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III (Fermentas) e GeneRuler™ 100 pb plus (Fermentas).

O DNA foi visualizado num transiluminador de luz UV e a sua imagem digitalizada (ATTA, Biosinstruments).

Tampão de carga (6 x): 0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % xileno cianol; 40 % sacarose ou 30 % glicerol (pH 8,0).

TAE (1x): 40 mM Tris-base; 20 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA; pH 8,3.

5. Preparação da amostra, determinação da sequência nucleotídica e análise dos fragmentos sequenciados

5.1.Extracção de bandas de gel de agarose

A purificação dos produtos de amplificação, foi efectuada com o kit *QIAquick® Gel Extraction Kit PCR* (Qiagen, Isaza, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

5.2. Análise da sequência nucleotídica

As sequências nucleotídicas dos produtos PCR purificados foram determinadas, em ambas as orientações, pela empresa STABvida.

As sequências nucleotídicas resultantes foram analisadas com o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) e CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk/clustalw) e comparadas com outras sequências depositadas nas bases de dados.

6. Estudo da variabilidade genética

Para o estudo da variabilidade genética, utilizou-se a técnica rep-PCR, estando os iniciadores e condições de reacção de PCR descritos nas tabelas 7 e 8

Tabela 7: Sequência dos iniciadores para amplificação por ERIC-PCR.

Reacção de tipagem	Designação do primer	Sequência respectiva	Referência
ERIC – PCR	ERIC 1	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	(Versalovic, Koeuth et al. 1991)
	ERIC 2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	

Tabela 8: Condições das reacções de amplificação para ERIC-PCR.

Etapas	Programa	
Desnaturação inicial	95 ° C	7 ‘
Desnaturação	94 ° C	1 ‘
Hibridação dos primers	52 ° C	1 ‘
Síntese das cadeias	65 ° C	8 ‘
Ciclos	35 Vezes	
Síntese final	65 ° C	16 ‘
Após o final da reacção	15 ° C	∞

6.1. Condições da Electroforese

Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (1,5%, Sigma), em tampão (TAE) 1X, ao qual se adicionou brometo de etídio a uma concentração final de 10mg/ml. O volume de amostra aplicado no gel foi 1/10 do volume de reacção, ao qual se adicionou tampão de carga 1x concentrado. A electroforese decorreu durante 3,5 horas a 100V

6.2 Análise dos perfis de clonalidade

A análise do géis com vista ao estudo filogenético das estirpes estudadas, foi efectuada com recurso ao software *Gelcompar* 4.1 (Applied Marths,. Bélgica), que permite avaliação de similaridades entre os diferentes padrões de bandas.

Resultados e Discussão

1. Isolados bacterianos

Colheitas do mesmo doente, mas com um mínimo de sete dias de intervalo, foram consideradas como sendo um isolado diferente. Destes isolados, 17 foram provenientes da consulta externa, 59 da urgência e 24 dos vários serviços de internamento, do Hospital Infante D. Pedro – Aveiro.

A Figura 12 mostra a distribuição dos 100 isolados de *E. coli* recolhidos, entre Outubro de 2007 e Fevereiro de 2008, dos diversos pacientes, de acordo com as faixas etárias.

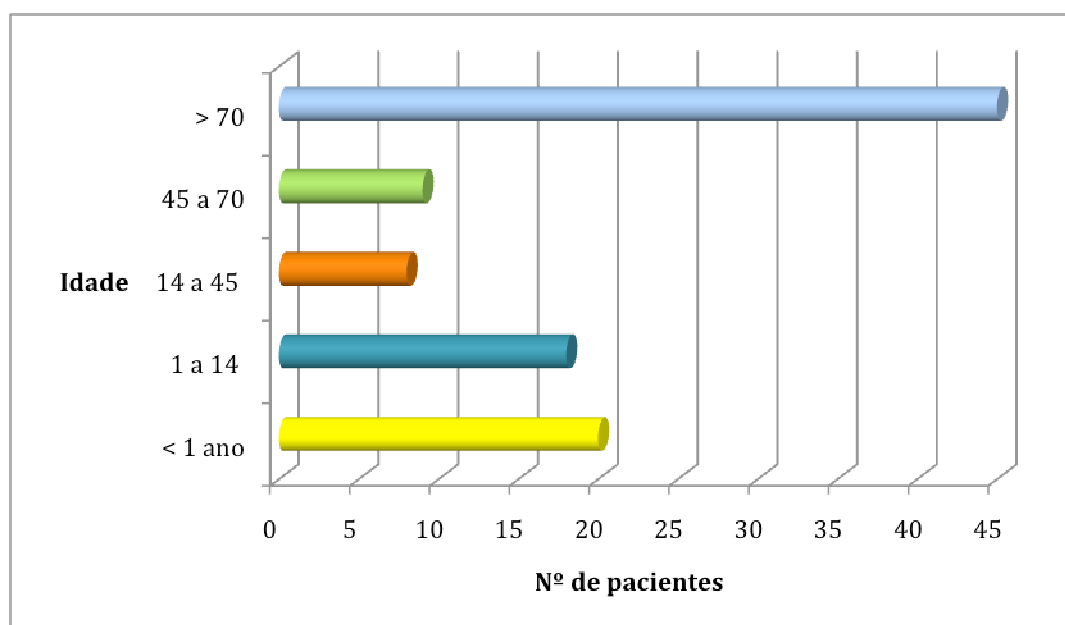


Figura 12- Representação gráfica dos isolados clínicos estudados, distribuídos pelas diferentes faixas etárias.

Na Figura 13 estão representados os produtos biológicos a partir dos quais foram isoladas as estirpes seleccionadas para o presente estudo.

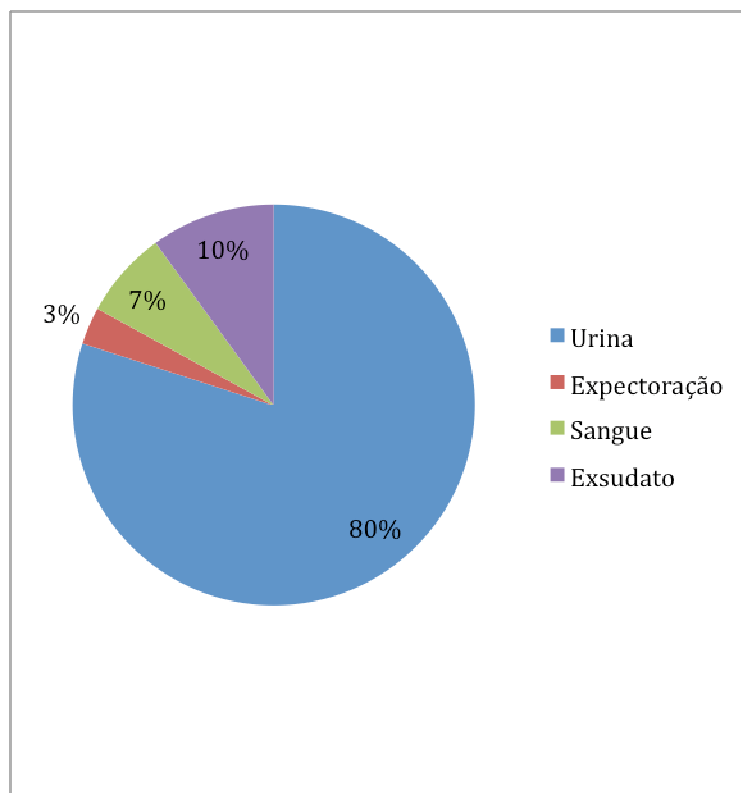


Figura 13- Origem dos isolados clínicos de *E. coli* seleccionados para o presente estudo.

2. Dados epidemiológicos

2.1. Susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*

A susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *E. coli* seleccionados para o presente estudo foi determinada com a carta AST-N060 no sistema Vitek 2 compact (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France)(Figura 14). Este sistema automatizado contém um módulo integrado (AES-Advanced Expert System) que analisa e valida os resultados obtidos, detectando discrepâncias entre a identificação do organismo e a susceptibilidade antimicrobiana do mesmo. A Figura 14, mostra o perfil de resistência aos diferentes antibióticos, encontrado nos isolados seleccionados para este estudo.

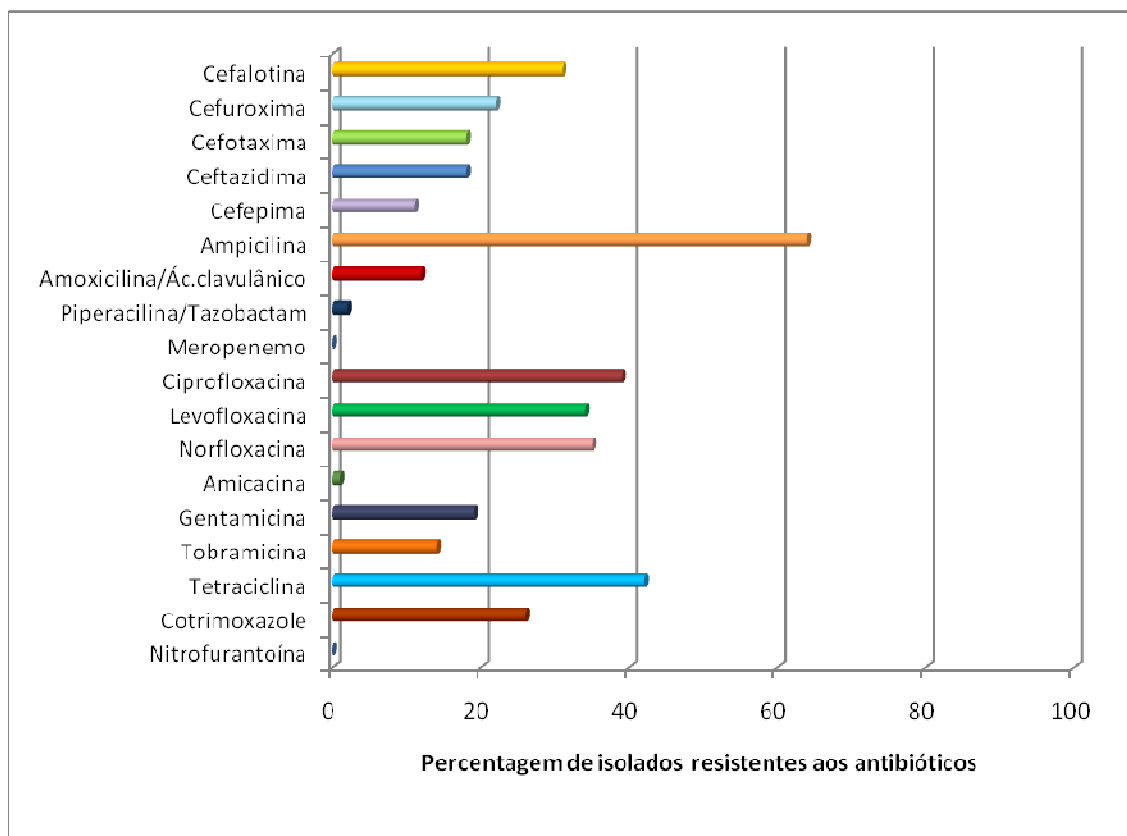


Figura 14- Perfil de resistência a antibióticos dos isolados clínicos estudados. O eixo do X representa valores de resistência traduzidos em percentagem e o eixo do Y representa os antibióticos testados.

Vários autores, sugerem que elevados níveis de resistência aos antibióticos estão relacionados com uma mais longa disponibilidade terapêutica de um antibiótico, como por exemplo, ampicilina e tetraciclina (White, McIver *et al.* 2001). No presente estudo verificou-se que a ampicilina foi o β -lactâmico que apresentou um maior nível de resistência, tendo esta sido verificada em 64% dos isolados (Figura 15).

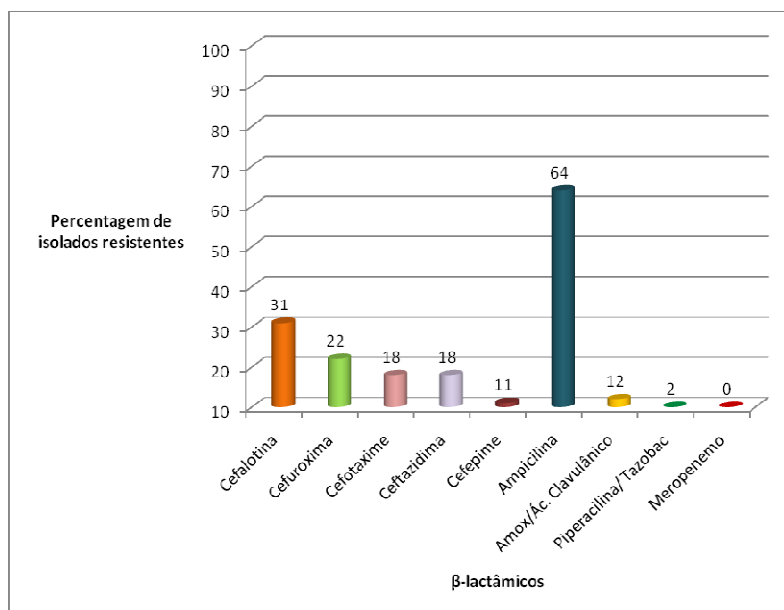


Figura 15- Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* a agentes β -lactâmicos, incluindo penicilinas e associação com inibidores das β -lactamases, cefalosporinas e carbapenemos.

Em nenhum dos isolados foi detectada susceptibilidade reduzida ao meropenemo, sendo este facto concordante com estudos recentes (Mendonça, Leitao *et al.* 2007) (Figura 15). O meropenemo, representante dos carbapenemos, constitui assim o único antibiótico efectivo contra todos os isolados, consequentemente a opção terapêutica em infecções sistémicas. Contudo, a sua eficácia terapêutica é ameaçada pela produção de metalo-betalactamases, nomeadamente pela família *Pseudomonaceae* (Morosini, Garcia-Castillo *et al.* 2006).

No que respeita às cefalosporinas, foi possível observar um gradiente de resistência quando analisadas as classes destes antibióticos. A maior percentagem (31%) de resistência foi à cefalotina (cefalosporina de primeira geração) e a menor percentagem (11%) ao cefepime (cefalosporina de quarta geração). Nas cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima e a ceftazidima, verificou-se que os isolados apresentavam resistência às duas drogas em simultâneo (n=18).

(Tofteland, Haldorsen *et al.* 2007) consideraram bactérias multirresistentes (BMR) aquelas que expressam resistência a duas ou mais classes de antibióticos não-beta-lactâmicos (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, nitrofurantoína e/ou trimetoprim) Tendo em conta estes critérios, 30 isolados do presente estudo foram considerados

multirresistentes, dos quais 17 oriundos da comunidade e os restantes provenientes de doentes hospitalizados (Figura 16).

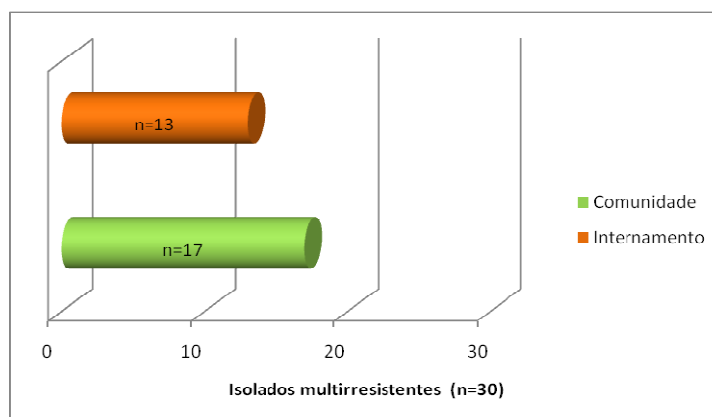


Figura 16 - Gráfico representando a distribuição dos isolados de *E. coli* multirresistentes

No que refere, às quinolonas, 39% dos isolados mostraram-se resistentes à Ciprofloxacina. A resistência verificada relativamente a esta classe é preocupante (Figura 17), uma vez que não houve diferença significativa entre a resistência a quinolonas de terceira geração e de quarta geração. Em 50% destes isolados observou-se concomitantemente resistência às cefalosporinas.

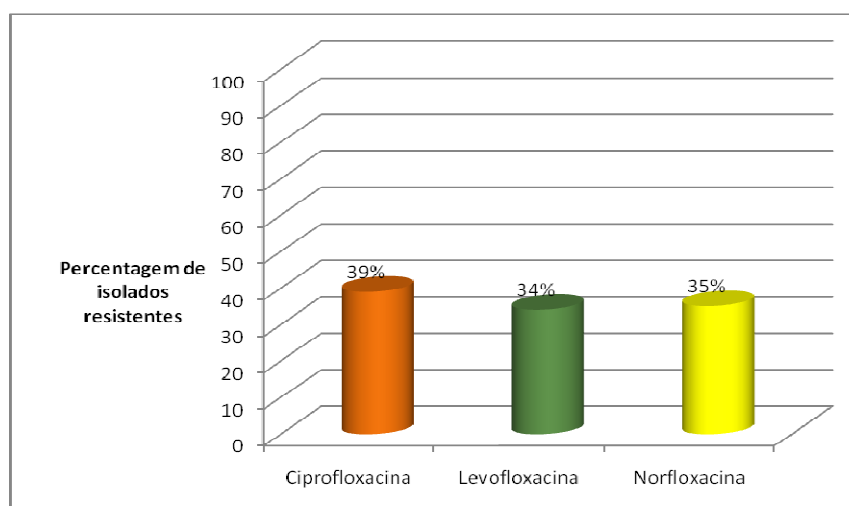


Figura 17 - Representação gráfica da percentagem de isolados de *E. coli* resistentes a quinolonas de segunda e terceira geração.

Tal como foi sugerido por Morossini e Garcia a co-resistência observada constitui um factor chave na manutenção e dispersão destes isolados. Sendo esta classe de antibióticos uma das mais utilizadas no tratamento de infecções do tracto urinário, a par com os β -lactâmicos e macrólidos, o nível crescente de resistência que as bactérias apresentam tende a inviabilizar a sua utilização.

Recentes estudos de vigilância epidemiológica, nomeadamente, realizados por Woodford e colaboradores, (2004), ilustram a alarmante associação de resistência a várias classes de agentes antimicrobianos entre estirpes produtoras de β -lactamases provenientes da comunidade.

Nos aminoglicosídeos a menor percentagem de resistência observou-se em relação à Amicacina (1%). A tobramicina e gentamicina apresentaram 14 e 19% de resistência respectivamente nos isolados estudados (Figura 18). O mesmo foi observado por outros autores em estudos anteriores (Morosini, Garcia-Castillo et al. 2006).

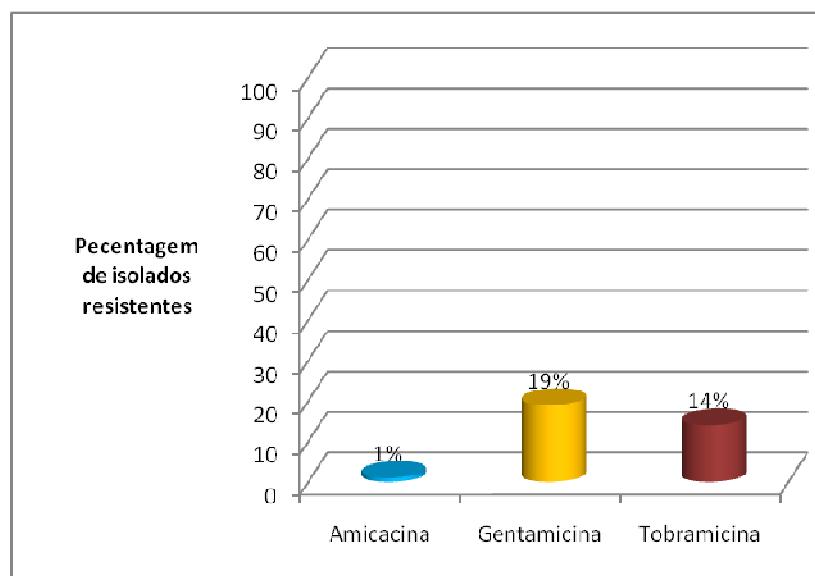


Figura 18- Distribuição de isolados de *E. coli* resistentes aos diferentes Aminoglicosídeos.

2.2 Detecção de β -lactamases de espectro alargado

A pesquisa de β -lactamases de espectro alargado foi previamente efectuada nos 100 isolados pelo sistema automatizado VITEK2 Compact (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France), aquando da sua identificação. Nos isolados reportados como positivos para a presença de ESBL (21%), esta foi posteriormente confirmada por tiras de Etest® ESBL CT/CTL, TZ/TZL e PM/PML, sendo os resultados concordantes.

A resistência a cefalosporinas de 3ª geração resultante da aquisição e expressão de ESBLs está bem documentada (Sturenburg, Sobottka et al. 2004). As implicações clínicas deste facto são inúmeras e sérias, e por isso a rápida detecção de estirpes produtoras de ESBL é fundamental para a aplicação de terapêutica adequada e para a monitorização do desenvolvimento de resistências. Como os métodos baseados em PCR, ainda não são rotina hospitalar, o Etest® surge como método eleito na rápida detecção de estirpes produtoras de ESBL.

De salientar que dos 21% de isolados onde a pesquisa foi positiva para ESBL, cinco são provenientes do serviço de Pediatria, o que uma vez mais vem dar relevo a crescente preocupação relativa à disseminação destes determinantes de resistência em faixas etárias cada vez mais jovens (Figura 19).

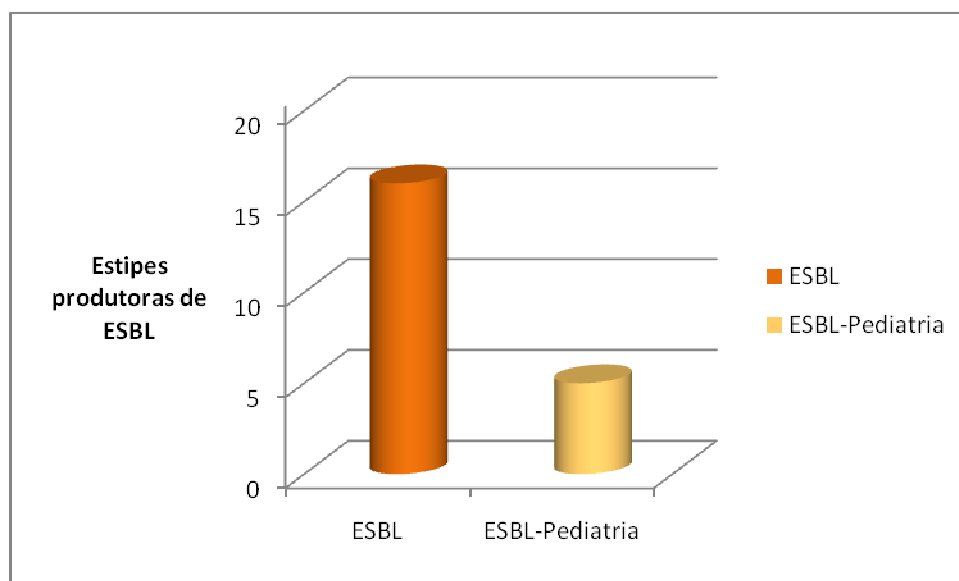


Figura 19 - Distribuição de estirpes produtoras de ESBL dando particular relevo aos isolados provenientes da Pediatria (24%).

3. Pesquisa de genes codificantes para β -lactamases por PCR.

Pesquisa de TEM, OXA, CTX-M

TEM

Na figura 20 apresenta-se o resultado de uma electroforese dos amplicões resultantes de uma reacção em cadeia da polimerase com oligonucleótidos específicos (Tabela 3) para β -lactamases do tipo TEM. Em 64 isolados obteve-se um amplicão com um tamanho de aproximadamente 425 pb.

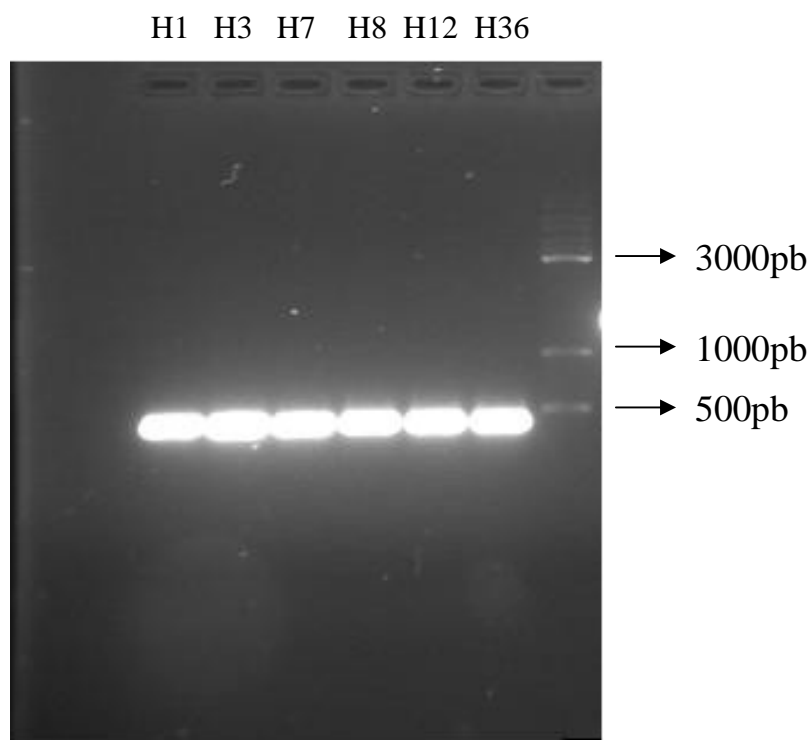


Figura 20- Fotografia de um gel de agarose dos produtos resultantes da amplificação do gene *bla*_{TEM}.

Em todos os isolados nos quais a pesquisa do gene *bla*_{TEM} foi positiva, observou-se resistência à ampicilina sugerindo forte correlação entre os resultados obtidos. A análise das sequências nucleotídicas obtidas revelou elevada homologia com o gene *bla*_{TEM-1} sendo este, tal como esperado, gene predominante entre a população estudada.

Na verdade, estudos anteriores mostraram que as β -lactamases TEM-1/-2 estão largamente disseminadas entre bacilos de Gram negativo e constituem o principal mecanismo de resistência às Penicilinas de espectro reduzido (Schmitt, Jacobs et al. 2007).

O fenótipo das TEM-IRT é caracterizado pela resistência à combinação dos beta-lactâmicos com inibidores das beta-lactamases e susceptibilidade às cefalosporinas (Chaibi, Sirot et al. 1999). Deste modo, foram seleccionados os isolados com fenótipo compatível com TEM-IRT (n=4), os quais foram submetidos a reacção de PCR com recurso a primers descritos por Coque *et al* (2001) que amplificam 1076 pb do gene *bla*_{TEM}. Contudo, após sequenciação e análise das sequências obtidas não se verificou homologia com TEM-IRT. Nestes casos, a resistência da *E. coli* às combinações do antibiótico β -lactâmico com os inibidores das β -lactamases, pode dever-se à hiperprodução da penicilinase TEM-1 ou à alteração da permeabilidade da membrana externa, que limita a entrada da droga (Alonso, Gerbaud et al. 2002).

OXA

Relativamente à pesquisa do gene *bla*_{OXA} a amplificação obtida tinha o tamanho esperado (814 pb) (Figura 21), e estava presente em 12 isolados. Após determinação da sequência nucleotídica, verificou-se que todos apresentaram elevada homologia com *bla*_{OXA-30}. Tendo por base estudos anteriormente efectuados, trata-se de uma enzima com especial actividade hidrolítica contra a cloxacilina e amoxicilina (Dubois, Arpin et al. 2003).

Por outro lado, em *Acinetobacter baumannii*, enzimas deste tipo, pertencentes à classe D de Ambler, têm sido consideradas as principais causas de resistência aos carbapenemos (Villegas, Kattan et al. 2007). Entre os genes *bla*_{OXA} encontrados, apenas um se localiza num integrão de classe 1. Este facto, descrito na literatura, alertou para a possibilidade de mais facilmente ocorrer a disseminação deste gene entre outros isolados (Dubois, Arpin et al. 2003).

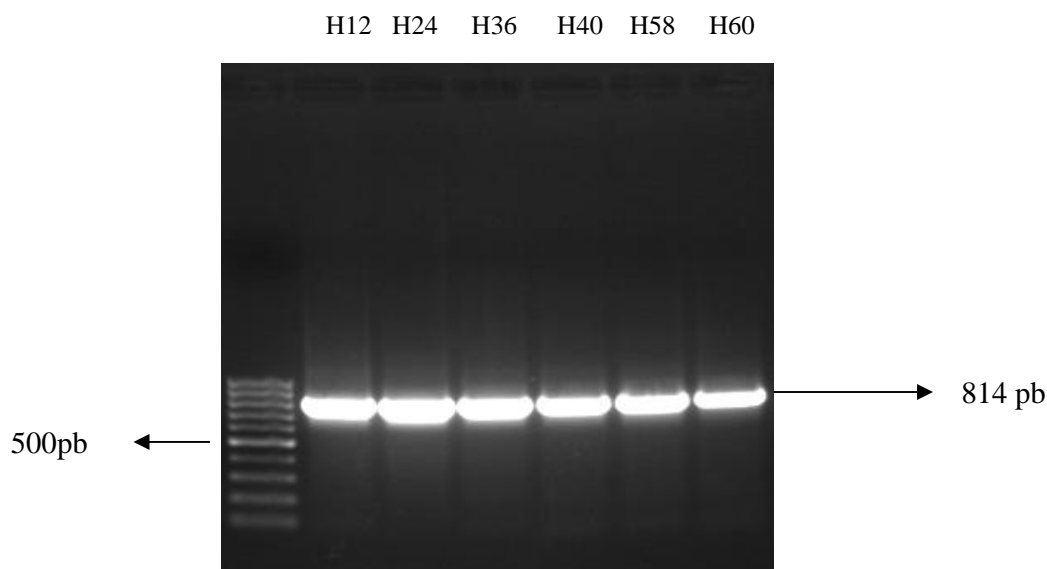


Figura 21- Fotografia de um gel de agarose dos produtos resultantes da amplificação do gene *bla*_{OXA}.

CTX-M

Na pesquisa do gene *bla*_{CTX-M} obtiveram-se produtos de amplificação em doze isolados. O amplicão tinha um tamanho 528pb, tal como esperado. Este gene, contido num plasmídeo, codifica enzimas que se caracterizam por hidrolisarem preferencialmente a cefotaxima (Eckert, Gautier et al. 2006). A recente disseminação deste gene entre várias espécies, constitui uma ameaça à eficácia, na clínica, das cefalosporinas de 3^a geração (Munday, Whitehead et al. 2004). Verificou-se assim, que todos estes isolados (n=12) apresentavam resistência à cefotaxima, ou seja, possuíam concentrações inibitórias mínimas (CIMs) iguais ou superiores a 64 mg/l.

Um estudo conduzido por Valverde *et al* (2004) em Espanha, mostra que estirpes produtoras de CTX-M são mais resistentes a diferentes classes de antibióticos do que bactérias que produzem outros tipos de ESBL. Concretamente, estirpes produtoras de CTX-M são mais resistentes à tetraciclina e ciprofloxacina do que estirpes produtoras de TEM-4 e SHV-12.

No presente estudo verificou-se que entre as estirpes produtoras de CTX-M, 75% revelaram-se resistentes às quinolonas e 42% resistentes à tetraciclina (Figura 22).

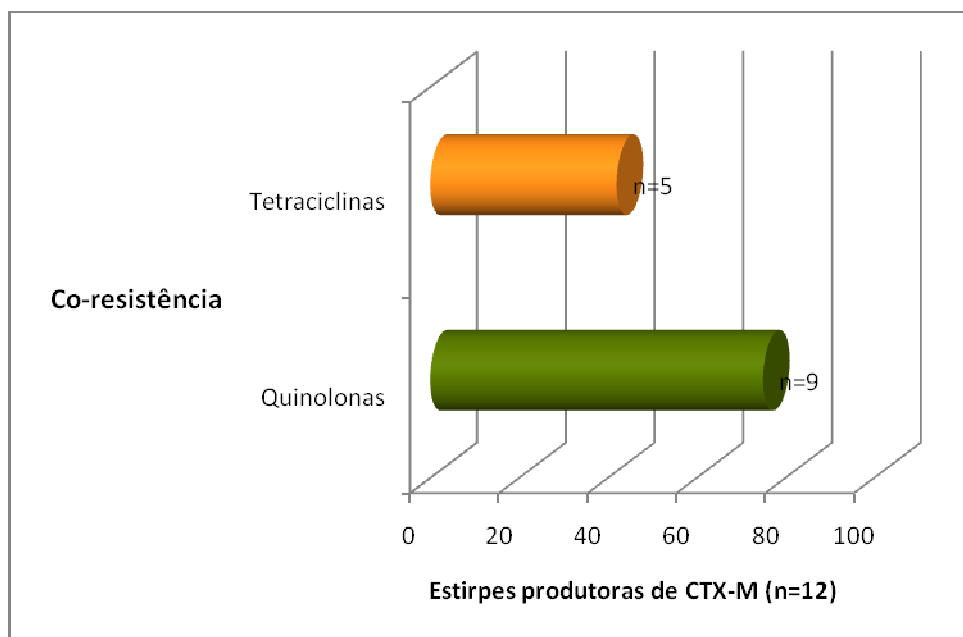


Figura 22- Representação gráfica da co-resistência observada em estirpes produtoras de CTX-M

Os genes que codificam as β -lactamases encontram-se habitualmente associados a sequências de inserção (IS), principalmente em Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa*. Em 2003 foi publicada parte de uma sequência de um elemento IS (ISEcp1-like) que estava associado ao gene *bla*_{CTX-M-15} e que tinha sido identificado em diversos isolados de Enterobacteriaceae, na Índia. Posteriormente, foram vários os estudos que confirmaram a presença deste elemento a montante do gene *bla*_{CTX-M} (Poirel, Decousser et al. 2003). Deste modo, o ambiente genético dos genes *bla*_{CTX-M} nos isolados deste estudo foi investigado. Pesquisou-se a presença do elemento ISEcp1 nos isolados em estudo.

A reacção de PCR com Iniciadores específicos, permitiu a detecção da sequência de inserção a montante de todos os genes *bla*_{CTX-M}. (Figura 23).

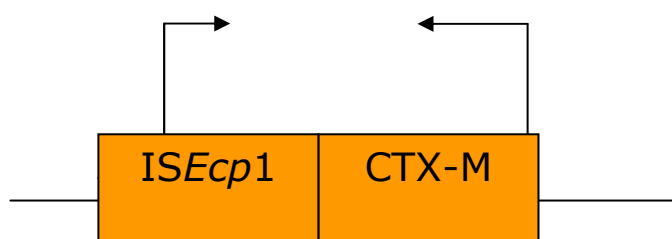


Figura 23 - Esquema representativo do ambiente genético associado a *bla*_{CTX-M}

Vários autores (Poirel, Lartigue et al. 2005) mostraram que este elemento tem a capacidade de mobilizar o gene *bla*_{CTX-M}, constituindo assim factor chave na sua disseminação. Por outro lado, estes elementos actuam como fortes promotores da expressão dos genes *bla*_{CTX-M}. Verificou-se também, após determinação da sequência nucleotídica que todos os genes identificados eram *bla*_{CTX-M-15}. Esta observação é concordante com o que foi descrito para Portugal, no que diz respeito à disseminação dos genes *bla*_{CTX-M}, onde está descrito que o gene predominante é o *bla*_{CTX-M-15} (Mendonça, Leitao et al. 2007).

Curiosamente, dos doze isolados positivos para o gene *bla*_{CTX-M}, cinco são provenientes da comunidade, sugerindo a sua presença noutros reservatórios, nomeadamente animais e ambientes aquáticos (Mendonça, Leitao et al. 2007).

Importa salientar que entre as demais amostras resistentes à cefotaxima não houve produto de amplificação. Nestes isolados deverá ser considerada a presença de outro mecanismo de resistência, tal como sugerido em estudos anteriores, nomeadamente a presença de β -lactamases plasmídicas (DHA-1) com forte poder hidrolítico sobre cefalosporinas de terceira geração (Yan, Ko et al. 2002).

A disseminação de bactérias produtoras de CTX-M na comunidade foi descrita recentemente em estudos realizados no Reino Unido. Num destes estudos, Pitout *et al* (2005), descreveu enterobactérias produtoras de ESBL isoladas a partir de amostras de flora fecal provenientes da comunidade. Os autores identificaram oito *E.coli* produtoras de ESBL e uma *Salmonella spp* entre 565 amostras de fezes. As beta-lactamases identificadas foram CTX-M-9, -14 e 15 e SHV-12.

Prats *et al* descrevem em Espanha, uma estirpe de *E. coli* produtora de CTX-M-9 em amostras de fezes de pacientes com gastroenterite aguda. Neste estudo foi também demonstrada a disseminação de plasmídeos semelhantes, entre diferentes clones, indicando a presença do mesmo plasmídeo nos clones.

Em Itália, Brigant *et al*, evidenciaram a emergência de estirpes produtoras de CTX-M, comparando os resultados obtidos entre 1999, onde apenas um isolado foi identificado e 2003, onde vinte e seis isolados foram reportados.

4. Pesquisa de Integrões

Da pesquisa do gene da integrase de classe 1 (*intI1*) nos isolados deste estudo, 17 revelaram-se positivos, o que indica que apenas estes possuem um ou mais integrões de classe 1. As suspensões bacterianas dos isolados de *E. coli* positivos foram posteriormente submetidos a um novo PCR para amplificação das suas regiões variáveis.

Foi detectada a presença de 6 cassetes de genes distintas com tamanhos que variaram entre os 800 e os 2000pb em 15 dos 17 isolados. Os genes predominantes nos “arrays” encontrados, foram variantes do gene *aadA*, que conferem resistência à estreptomicina e espectomicina. Estas cassetes representam 50% do total de cassetes encontradas e incluem *aadA1*, *aadA2* e *aadA5*.

Embora a estreptomicina e a espectomicina sejam antibióticos raramente usados na terapêutica, as cassetes de genes *aadA* são prevalentes nas zonas variáveis. Segundo diversos autores a prevalência destes genes afasta a possibilidade da integrase ter a capacidade de os excisar (White, McIver et al. 2001). Mesmo quando os antibióticos deixam de ser usados na terapêutica, os genes que codificam a resistência, não são necessariamente perdidos. Contudo, vários estudos demonstraram que uma nova exposição ao antibiótico conduz a um reposicionamento da cassette de genes pela integrase. Sendo que o gene posicionado mais perto do promotor é expresso com maior eficiência (Collis and Hall 1995).

Os genes *dfr* que codificam para a resistência ao trimetoprim representam 25% da cassetes detectadas. A resistência ao trimetoprim e sulfonamidas é habitualmente determinada por genes inseridos em integrões (Machado, Canton et al. 2005). Contudo, no nosso presente estudo não foi possível detectar integrões em todas as amostras que exibiam resistência ao cotrimoxazole. Deste modo, a hipótese da presença de integrões de classe 1 que escapam aos clássicos procedimentos de amplificação da zona variável devem ser considerados (Machado, Canton et al. 2005).

Tabela 9: Isolados positivos para a presença de integrões de classe 1, genes cassette amplificados e respectivo tamanho.

Isolado	Cassetes de Genes	Tamanho do “array” (pb)
H9	<i>dfrA1-aadA1</i>	1900
H15	<i>dfrA1-aadA1</i>	1900
H40	<i>bla_{OXA30}-aadA1</i>	2300
H42	<i>dfrA25</i>	800
	<i>dfrA12-aadA2</i>	2200
H46	<i>spec-aadA1</i>	1200
H49	<i>dfrA17-aadA5</i>	2000
H57	<i>dfrA17-aadA5</i>	1900
H63	<i>dfrA17-aadA5</i>	1800
H65	<i>dfrA1-aadA1</i>	1800
H82	<i>dfrA1-aadA1</i>	2200

Dos integrões encontrados, salienta-se o que está presente no isolado H40 (Tabela 9) em que o “array” é composto por (*bla_{OXA30}-aadA1*) e no isolado H57 cujo “array” é formado por (*dfrA17-aadA5*).

O “array” do isolado H40 foi descrito em 2003 (GenBank número de acesso: AY224185) , tendo sido encontrado em *E. coli* (Dubois, Arpin et al. 2003). O do isolado H57 está largamente disseminado, tendo sido já descrito em diferentes espécies bacterianas como por exemplo *Acinetobacter baumannii* (Genbank número de acesso EF015498), *Enterobacter cloacae* (Genbank número de acesso EF571855), *Pseudomonas aeruginosa* (Genbank número de acesso DQ838665). Quando descrito em *E. coli* este array aparece proveniente quer de origem animal (Genbank número de acesso DQ663488), quer de isolados clínicos (Genbank número de acesso AB194702 e FJ0011847) e disperso um pouco por todo o mundo, tendo sido já descrito na China, Turquia e Holanda. Este tipo de resultado é elucidativo da forte disseminação de determinantes genéticos de resistência que a evolução das sociedades veio proporcionar.

Nas estirpes H59 e H62, apesar da obtenção de um fragmento aquando da pesquisa do gene *int1*, não foi possível obter amplificação da zona variável. Esta situação está descrita em diversos estudos, sendo atribuída, possivelmente à perda de componentes do

segmento conservado 3'CS, nomeadamente os genes *qacEΔI* e o *sulI* (White, McIver *et al.* 2001). Em *Pseudomonas aeruginosa*, estes genes foram substituídos por genes do transposição, TniC. Outros estudos demonstraram em enterobactérias, que estes genes foram substituídos pelo gene *sul3*. Uma vez que há décadas que a estrutura clássica de um intregão de classe 1 assenta na presença de dois segmentos conservados, toda a pesquisa da região variável tende a ser feita com base nestes mesmos segmentos. Uma vez que parecem estar a ser mais frequentes os relatos de que falha a amplificação das zonas variáveis com base em iniciadores desenhados para os segmentos conservados, sugere-se que se faça a pesquisa das regiões variáveis colocando a hipótese que o segmento conservado 3'CS possa não estar presente.

Atendendo à resistência observada nos restantes isolados, e uma vez que esta não parece estar codificada em genes que fossem amplificados nos isolados em estudo, depreende-se que existem outros mecanismos de resistência codificados por genes não associados a elementos móveis.

5 Estudo da variabilidade genética

A Figura 24 mostra o perfil de amplificação dos 100 isolados de *E. coli* utilizando iniciadores ERIC. Esta amplificação só foi positiva para 88 dos isolados em estudo. O número de bandas variou de 8 a 12 por isolado, tendo sido identificados 6 clones (H2/H4; H36/H7 ; H82/H60).

H2/H4

Dos clones encontrados, verificou-se posteriormente que H2/H4 foram isolados do mesmo doente com dois dias de intervalo tendo sido por isso excluídos do estudo, uma vez que se tinha por base um critério que estabelecia um mínimo de 7 dias de intervalo para se considerar isolados diferentes.

H36/H7

Quando analisada a proveniência dos clones H36/H7, verificou-se que H7 foi isolado de um paciente de 79 anos do sexo masculino e H36 foi isolado de uma paciente de 83 anos e do sexo feminino, ambos provenientes da comunidade.

Analisado o seu perfil de resistências verificou-se que este era bastante díspar, apresentando o isolado H36 um maior número de resistências. Quando comparado o conteúdo de determinantes genéticos de resistência móveis que ambos os isolados possuíam verificou-se claramente que o isolado mais resistente (H36) possuía mais elementos móveis. O isolado 36 foi positivo para a presença de *bla*_{CTX-M-15}, que segundo a literatura justificaria a sua resistência às cefalosporinas de 3^a geração.

Tal como também já foi amplamente descrito, verificou-se a presença da sequência de inserção *ISEcp1* a montante da *bla*_{CTX-M-15}. Sendo esta sequência de inserção um forte agente mobilizador de genes de resistência, a disseminação destes na população bacteriana fica bastante facilitada.

Uma vez mais importa salientar o facto de este isolado ser oriundo da comunidade e apresentar estruturas genéticas que até a relativamente pouco tempo eram pouco frequentes em isolados com esta proveniência. Este facto reforça o que já foi alertado relativamente à inversão do fluxo de genes, nomeadamente que estaríamos a assistir a uma importação de genes de resistência da comunidade.

O isolado H36 foi ainda positivo para a presença de *bla*_{OXA30}, não fazendo esta parte da zona variável de um integrão de classe 1 como é frequentemente descrito. Assim e como já reportado por outros autores este gene estaria associado a um elemento que permitisse a sua mobilização.

Em nenhum dos isolados (H7/H36) se verificou a presença do gene *Int1* o qual codifica para a integrase e por consequência seria indicativo da presença de um integrão de classe 1.

H82/H60

De forma semelhante, os clones H82/H60 foram também isolados de pacientes idosos de sexos diferentes e ambos oriundos da comunidade.

Relativamente ao seu perfil de resistências, também este se revelou bastante díspar, apresentando o isolado H60 um maior número de resistências. Também no caso do isolado H60 se verificou a presença da do gene *bla*_{CTX-M} associado à sequência de inserção *ISEcp1* e como já referido acima também neste caso esta associação de estruturas genéticas foi encontrada num isolado proveniente da comunidade.

À semelhança do verificado no isolado H36, também no caso do isolado H60, se verificou a presença do gene *bla*_{OXA}, e também neste caso este gene não fazia parte da zona variável de um integrão de classe 1, sendo sugerido que possa estar ligado a um gene de mobilização. Tal como o descrito para o par anterior, também nos isolados H82/H60 não foi amplificado o gene *Int1*.

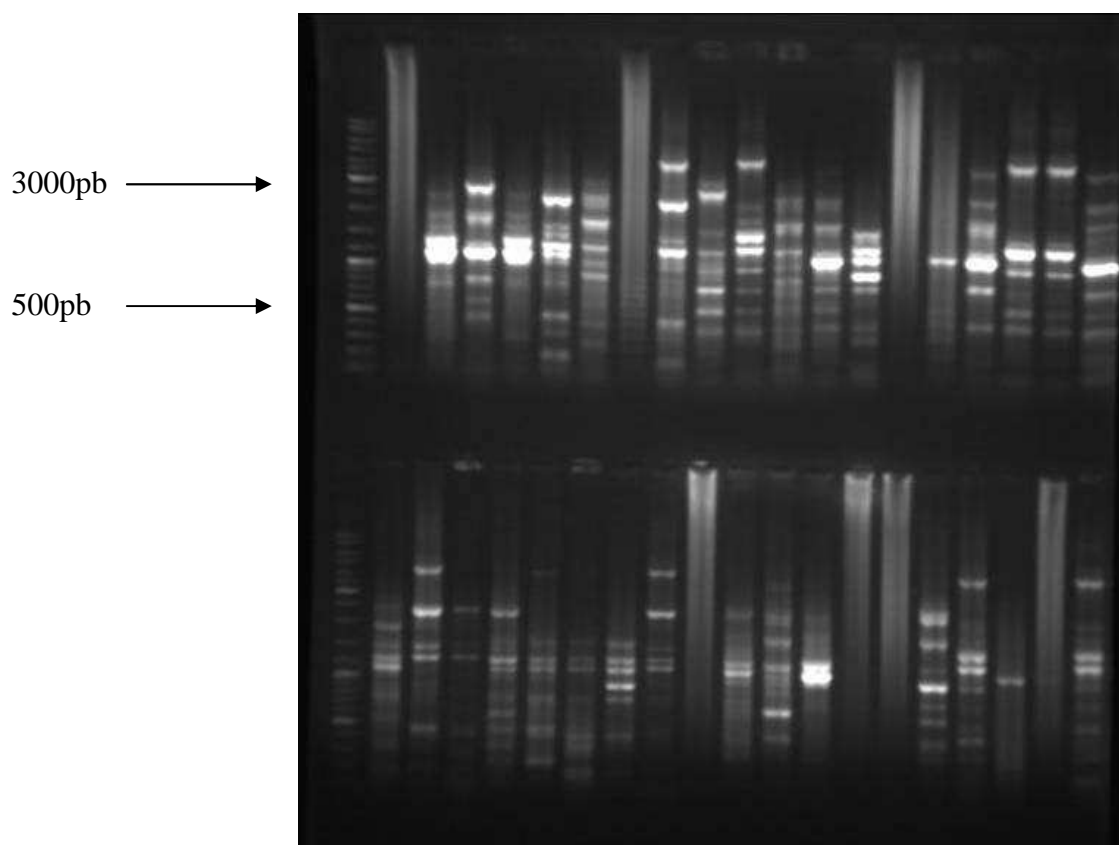


Figura 24 - Perfis electroforéticos dos fragmentos obtidos após amplificação por PCR com os iniciadores ERIC, apresentados na Tabela 7.

De um modo geral e pela análise do dendrograma obtido com base nos perfis electroforéticos foi possível concluir que existe uma grande variabilidade genética entre os isolados em estudo. Apenas em 3 pares de clones (H36/H7; H82/H60; H2/H4) se verificou homologia de 100%. Em cerca de 16 isolados verificou-se homologia superior a 80%, tendo os restantes isolados apresentado homologia inferior.

Estes resultados acabam por reflectir os resultados obtidos relativamente à proveniência dos isolados. É sabido que a população hospitalar não tem uma grande variabilidade genética, sendo as populações mais ou menos constantes na sua maioria. Dado que neste estudo se obteve um grande número de isolados oriundos da comunidade, onde a população bacteriana nomeadamente de *E. coli* apresenta uma variabilidade considerável, será de fácil entendimento a grande variabilidade obtida entre os isolados.

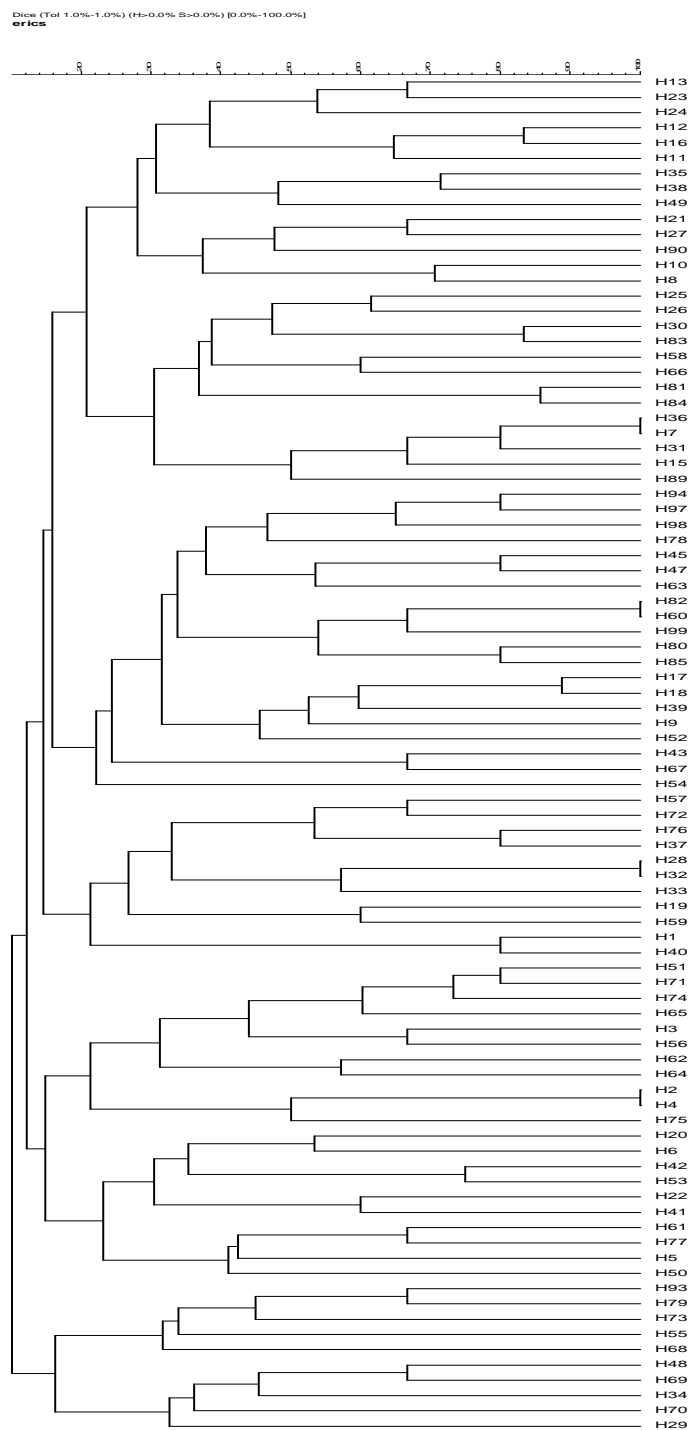


Figura 25- Dendrograma obtido após a análise com recurso ao Software do programa Gelcompar II, dos perfis de ERIC obtidos.

Do presente estudo foi possível inferir as seguintes conclusões:

1. A maior percentagem de resistência verificou-se relativamente à ampicilina e às cefalosporinas de primeira geração, como seria de esperar. Este resultado leva a sugerir que estes antibióticos não deveriam ser usados como agente único no tratamento de infecções por *E. coli*. Verificou-se ainda que 21% dos isolados apresentavam um perfil de sensibilidade a todos os antibióticos testados.
2. O conjunto de cassetes de genes encontrados na população em estudo demonstra, uma vez mais, a facilidade com que actualmente genes de resistência podem ser disseminados. O exemplo do “array” *dfrA17-aadA5* é ilustrativo deste facto. Este “array” de genes identificado na população em estudo, foi previamente descrito em diferentes géneros bacterianos de diferentes origens e em diferentes partes do globo.
3. A presença de diferentes tipos de β -lactamases de espectro alargado na população em estudo demonstra a importância do uso de métodos de detecção de isolados produtores de ESBL, na rotina hospitalar, de modo a minimizar as falhas terapêuticas. O presente estudo confirma ainda a disseminação da *bla*_{CTX-M-15} no ambiente hospitalar (Hospital Infante D. Pedro – Aveiro) e na comunidade, à semelhança do que se verifica a nível nacional. Sendo estas beta-lactamases mediadas por plasmídeos, este facto representa um problema epidemiológico, uma vez que estes elementos podem ser mobilizados entre estirpes e até mesmo entre espécies.
4. A elevada prevalência de estirpes de *E. coli* resistentes provenientes da Pediatria e a emergência de estirpes multirresistentes nesta população em particular, requer uma atenção redobrada. Uma vez que muitos dos agentes antimicrobianos utilizados não são indicados para pacientes pediátricos o tratamento de infecções do tracto urinário nestes pacientes pode estar comprometido.

5. Verificou-se a existência de uma grande variabilidade genética entre os isolados estudados, facto este que pode estar relacionado com uma grande fatia dos isolados ter sido proveniente da comunidade. Os resultados obtidos sugerem uma inversão no fluxo de estirpes multirresistentes, tal como tem sido reportado pela comunidade científica, verificando-se actualmente uma importação de estirpes multirresistentes da comunidade para o meio hospitalar.

- A. C. Fluit, F. J. S. (2004). "Resistance integrons and super-integrons." Clinical Microbiology & Infection **10**(4): 272-288.
- Aarestrup, F. M., H. C. Wegener, et al. (2008). "Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies." Expert Review of Anti-infective Therapy **6**(5): 733-750.
- Abeylath, S. C. and E. Turos (2008). "Drug delivery approaches to overcome bacterial resistance to β -lactam antibiotics." Expert Opinion on Drug Delivery **5**(9): 931-949.
- Alonso, R., G. Gerbaud, et al. (2002). "TEM-103/IRT-28 β -Lactamase, a New TEM Variant Produced by Escherichia coli BM4511." Antimicrob. Agents Chemother. **46**(11): 3627-3629.
- Appelbaum, P. C. and P. A. Hunter (2000). "The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives." International Journal of Antimicrobial Agents **16**(1): 5-15.
- Barlow, R. S., J. M. Pemberton, et al. (2004). "Isolation and Characterization of Integron-Containing Bacteria without Antibiotic Selection." Antimicrob. Agents Chemother. **48**(3): 838-842.
- Bebear, C. M. and S. Pereyre (2005). "Mechanisms of Drug Resistance in Mycoplasma pneumoniae." Current Drug Targets - Infectious Disorders **5**: 263-271.
- Bush, K., G. A. Jacoby, et al. (1995). "A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob. Agents Chemother. **39**(6): 1211-1233.
- Chaibi, E. B., D. Sirot, et al. (1999). "Inhibitor-resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics." J. Antimicrob. Chemother. **43**(4): 447-458.
- CLSI (2006). "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition."
- Collis, C. M. and R. M. Hall (1995). "Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons." Antimicrob. Agents Chemother. **39**(1): 155-162.
- Coque, R. C. a. T. M. (2006). "The CTX-M β -lactamase pandemic." Current Opinion in Microbiology **9**(5): 466-475.
- Coque, T. M., A. Oliver, et al. (2002). "Genes Encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 Extended-Spectrum β -Lactamases Are Carried by Multiple Klebsiella pneumoniae Clones in a Single Hospital (Madrid, 1989 to 2000)." Antimicrob. Agents Chemother. **46**(2): 500-510.
- Drlica, K. and X. Zhao (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**(3): 377-392.
- Dubois, V., C. Arpin, et al. (2003). "Decreased Susceptibility to Cefepime in a Clinical Strain of Escherichia coli Related to Plasmid- and Integron-Encoded OXA-30 β -Lactamase." Antimicrob. Agents Chemother. **47**(7): 2380-2381.
- Eckert, C., V. Gautier, et al. (2006). "DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes." J. Antimicrob. Chemother. **57**(1): 14-23.
- Fajardo, A., N. Martinez-Martinez, et al. (2008). "The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens." PLoS ONE **3**(2): e1619.

- Grohmann, E., G. Muth, et al. (2003). "Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67**(2): 277-301.
- Henriques, I. S., F. t. Fonseca, et al. (2006). "Occurrence and diversity of integrons and [beta]-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters." Research in Microbiology **157**(10): 938-947.
- Hopkins, K. L., R. H. Davies, et al. (2005). "Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments." International Journal of Antimicrobial Agents **25**(5): 358-373.
- Kim, J.-S., D. K. Carver, et al. (2006). "Natural Transformation-Mediated Transfer of Erythromycin Resistance in *Campylobacter coli* Strains from Turkeys and Swine." Appl. Environ. Microbiol. **72**(2): 1316-1321.
- Kotra, L. P., J. Haddad, et al. (2000). "Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance." Antimicrob. Agents Chemother. **44**(12): 3249-3256.
- Li, X.-Z. (2005). "Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms." International Journal of Antimicrobial Agents **25**(6): 453-463.
- Ligon, B. L. (2004). "Penicillin: its discovery and early development." Seminars in Pediatric Infectious Diseases **15**(1): 52-57.
- Livermore, D. M. and N. Woodford (2006). "The [beta]-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*." Trends in Microbiology **14**(9): 413-420.
- MacGowan, A. P. and B. W. P. o. R. S. on behalf of the (2008). "Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy." J. Antimicrob. Chemother. **62**(suppl_2): ii105-114.
- Machado, E., R. Canton, et al. (2005). "Integron Content of Extended-Spectrum-{beta}-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(5): 1823-1829.
- Magnet, S. and J. S. Blanchard (2005). "Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance." Chemical Reviews **105**(2): 477-498.
- Malhotra-Kumar, S., A. Mazzariol, et al. (2008). "Unusual resistance patterns in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* harbouring erm(A)." J. Antimicrob. Chemother.: dkn432.
- Martinez, J. L. and F. Baquero (2002). "Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance." Clin. Microbiol. Rev. **15**(4): 647-679.
- McManus, M. C. (1997). "Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents." Am J Health Syst Pharm **54**(12): 1420-1433.
- Mendonca, N., J. Leitao, et al. (2007). "Spread of Extended-Spectrum {beta}-Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal." Antimicrob. Agents Chemother. **51**(6): 1946-1955.
- Morosini, M.-I., M. Garcia-Castillo, et al. (2006). "Antibiotic Coresistance in Extended-Spectrum-{beta}-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and In Vitro Activity of Tigecycline." Antimicrob. Agents Chemother. **50**(8): 2695-2699.
- Munday, C. J., G. M. Whitehead, et al. (2004). "Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamases in York, UK." J. Antimicrob. Chemother. **54**(3): 628-633.
- Nordmann, P. and L. Poirel (2005). "Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae." J. Antimicrob. Chemother. **56**(3): 463-469.

- Pallecchi, L., A. Bartoloni, et al. (2008). "Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications." Expert Review of Anti-infective Therapy **6**(5): 725-732.
- Perez-Perez, F. J. and N. D. Hanson (2002). "Detection of Plasmid-Mediated AmpC {beta}-Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR." J. Clin. Microbiol. **40**(6): 2153-2162.
- Pitout, J. D. D., P. Nordmann, et al. (2005). "Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum {beta}-lactamases (ESBLs) in the community." J. Antimicrob. Chemother. **56**(1): 52-59.
- Poirel, L., J.-W. Decousser, et al. (2003). "Insertion Sequence ISEcp1B Is Involved in Expression and Mobilization of a blaCTX-M {beta}-Lactamase Gene." Antimicrob. Agents Chemother. **47**(9): 2938-2945.
- Poirel, L., M.-F. Lartigue, et al. (2005). "ISEcp1B-Mediated Transposition of blaCTX-M in Escherichia coli." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(1): 447-450.
- Poirel, L., A. Liard, et al. (2005). "Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants." J. Antimicrob. Chemother. **56**(6): 1118-1121.
- Poirel, L., J.-M. Rodriguez-Martinez, et al. (2005). "Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(8): 3523-3525.
- R. H. Deurenberg, C. V. S. K. A. W. F. C. A. B. E. E. S. (2007). "The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Clinical Microbiology and Infection **13**(3): 222-235.
- Ruiz, J. (2003). "Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection." J. Antimicrob. Chemother. **51**(5): 1109-1117.
- Schmitt, J., E. Jacobs, et al. (2007). "Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae from patients of two hospitals in Saxony, Germany." J Med Microbiol **56**(2): 241-249.
- Schmitz, F.-J., D. Hafner, et al. (2001). "Increased Prevalence of Class I Integrons in Escherichia coli, Klebsiella Species, and Enterobacter Species Isolates over a 7-Year Period in a German University Hospital." J. Clin. Microbiol. **39**(10): 3724-3726.
- Schwartz, R. S. (2004). "Paul Ehrlich's Magic Bullets." N Engl J Med **350**(11): 1079-1080.
- Shea, K. M. (2003). "Antibiotic Resistance: What Is the Impact of Agricultural Uses of Antibiotics on Children's Health?" Pediatrics **112**(1): 253-258.
- Singh, A., R. V. Goering, et al. (2006). "Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection." Clin. Microbiol. Rev. **19**(3): 512-530.
- Sipahi, O. R. (2008). "Economics of antibiotic resistance." Expert Review of Anti-infective Therapy **6**(4): 523-539.
- Smet, A., A. Martel, et al. (2008). "Diversity of Extended-Spectrum {beta}-Lactamases and Class C {beta}-Lactamases among Cloacal Escherichia coli Isolates in Belgian Broiler Farms." Antimicrob. Agents Chemother. **52**(4): 1238-1243.
- Spink WW, F. V. (1945). "Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strain of Staphylococcus." Science **102**: 102-221.
- Sturenburg, E., I. Sobottka, et al. (2004). "Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum {beta}-lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection." J. Antimicrob. Chemother. **54**(1): 134-138.

- Summers, A. O. (2006). "Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic Multi-Resistance Problem." Animal Biotechnology **17**(2): 125 - 135.
- Tofteland, S., B. Haldorsen, et al. (2007). "Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway." J. Clin. Microbiol. **45**(1): 199-205.
- Toleman, M. A., P. M. Bennett, et al. (2006). "ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century?" Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**(2): 296-316.
- Toma, C., E. Martinez Espinosa, et al. (2004). "Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*." J. Clin. Microbiol. **42**(11): 4937-4946.
- Tumbarello, M., M. Sali, et al. (2008). "Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli*: Risk Factors for Inadequate Initial Antimicrobial Therapy." Antimicrob. Agents Chemother. **52**(9): 3244-3252.
- Turner, S. M., R. R. Chaudhuri, et al. (2006). "Phylogenetic Comparisons Reveal Multiple Acquisitions of the Toxin Genes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains of Different Evolutionary Lineages." J. Clin. Microbiol. **44**(12): 4528-4536.
- Versalovic, J., T. Koeuth, et al. (1991). "Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes." Nucl. Acids Res. **19**(24): 6823-6831.
- Villegas, M. V., J. N. Kattan, et al. (2007). "Dissemination of *Acinetobacter baumannii* Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian Hospitals." Antimicrob. Agents Chemother. **51**(6): 2001-2004.
- Walsh, T. R. (2006). "Combinatorial genetic evolution of multiresistance." Current Opinion in Microbiology **9**(5): 476-482.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, et al. (2005). "Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm?" Clin. Microbiol. Rev. **18**(2): 306-325.
- Walther-Rasmussen, J. and N. Hoiby (2007). "Class A carbapenemases." J. Antimicrob. Chemother. **60**(3): 470-482.
- Warhurst, D. C. (1981). "CINCHONA ALKALOIDS AND MALARIA." The Lancet **318**(8259): 1346-1346.
- White, P. A., C. J. McIver, et al. (2001). "Integrations and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae." Antimicrob. Agents Chemother. **45**(9): 2658-2661.
- Yamada, M., T. Watanabe, et al. (2007). "Crystal Structure of Cefditoren Complexed with *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 2X: Structural Basis for Its High Antimicrobial Activity." Antimicrob. Agents Chemother. **51**(11): 3902-3907.
- Yan, J.-J., W.-C. Ko, et al. (2002). "Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing Inducible DHA-1 β -Lactamase in a University Hospital in Taiwan." J. Clin. Microbiol. **40**(9): 3121-3126.
- Zeph, L. R., M. A. Onaga, et al. (1988). "Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil." Appl. Environ. Microbiol. **54**(7): 1731-1737.
- Zwar, N., J. Wolk, et al. (1999). "Influencing antibiotic prescribing in general practice: a trial of prescriber feedback and management guidelines." Fam. Pract. **16**(5): 495-500.